

Verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation eines Produktes aus einer reversen Transkription eines Pools von Nukleinsäuren eines bestimmten Typs, wobei dieser Pool von Nukleinsäuren aus einer komplexen biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion stammt.

Aufgrund der zunehmenden Spezifität und Sensibilität bei der Präparation von Nukleinsäuren, hat diese in den letzten Jahren nicht nur im Bereich der biotechnologischen Grundlagenforschung, sondern verstärkt auch in medizinischen Bereichen, vornehmlich für diagnostische Zwecke, stetig an Bedeutung gewonnen. Da viele molekularbiologische Applikationen die Separation bestimmter Nukleinsäuren voneinander erfordern, liegt hierbei das Hauptaugenmerk auf der Verbesserung und/oder der Vereinfachung von Verfahren zur Trennung und/oder Isolierung von Nukleinsäuren. Dazu zählen insbesondere die Separation einzelner Nukleinsäure-Typen aus komplexen biologischen Proben und/oder aus Produkten enzymatischer Reaktionen.

Hierbei werden die potentiellen Nukleinsäure-Quellen zunächst mit Hilfe an sich bekannter Verfahren aufgeschlossen. Anschließend werden die Nukleinsäuren unter Verwendung von ebenfalls an sich bekannten Verfahren isoliert. Finden in der Folge derartiger Isolierungsprozedere weitere Verfahrensschritte beziehungsweise Downstream-Analysen wie Transkriptions- und/oder enzymatische Amplifikationsreaktionen Anwendung, sollten die isolierten Nukleinsäuren jedoch nicht nur frei von störenden Zellbestandteilen und/oder Metaboliten vorliegen. Um die Spezifität und Empfindlichkeit derartiger Applikationen zu erhöhen, ist häufig noch eine zusätzliche Aufreinigung einzelner Nukleinsäure-Typen erforderlich.

Unter unterschiedlichen Nukleinsäure-Typen im Sinne der Erfindung werden alle einzel- oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und/oder Ribonukleinsäuren (RNA), wie beispielsweise copy DNA (cDNA), genomische DNA (gDNA), messenger RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA), small nuclear RNA (snRNA), bakterielle DNA, Plasmid DNA (pDNA), virale DNA oder virale RNA etc., und/oder modifizierte oder artifizielle Nukleinsäuren oder auch Nukleinsäure-Analoga, wie Peptide Nucleic Acids (PNA) oder Locked Nucleic Acids (LNA) etc., verstanden.

BESTÄTIGUNGSKOPIE

Zur Analyse von Genexpressionsmustern insbesondere auf der Ebene von RNA sind zahlreiche Methoden bekannt. Neben diversen anderen Methoden zählen reverse Transkriptions-Reaktionen mit Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sowie Array-Analysen zu den am häufigsten angewandten Verfahren. Eine Gemeinsamkeit dieser Verfahren ist, dass die interessierende mRNA (bis auf Ausnahmen, z. B. durch direktes Labeling von RNA) nicht direkt gemessen wird, sondern zuvor in die entsprechende cDNA umgeschrieben wird. Derzeit gängige Systeme weisen jedoch beim Arbeiten mit biologischem Material speziell im Bereich der Molekularbiologie und/oder der Diagnostik bereits an dieser Stelle ein grundlegendes Problem auf.

Um die interessierende(n) mRNA(s) in der gewünschten Downstream-Analyse möglichst sensitiv messen zu können, muss bevorzugt auch nur diese RNA revers transkribiert werden. Da in vielen biologischen Ausgangsmaterialien, wie beispielsweise Gehirn-, Leber- oder Muskelgewebe, Vollblut, isolierten Leukozyten oder anderen biologischen Materialien sowie in Produkten enzymatischer Reaktionen jedoch bestimmte Transkripte in sehr hohen Kopienzahlen vorliegen (wie beispielsweise Globin mRNA Transkripte in RNA Präparationen aus Vollblut oder rRNA Transkripte in allen Total-RNA-Isolierungen), werden beispielsweise durch unspezifisches Priming und/oder Mispriming auch diese RNA-Transkripte bis zu einem gewissen Grad revers transkribiert. Diese aus den sogenannten non-mRNA-Templates synthetisierten cDNAs sowie die aus den nicht interessierenden, gegebenenfalls überexprimierten mRNAs hergestellten cDNAs verursachen jedoch eine wesentliche Verminderung der Empfindlichkeit der Downstream-Analysen der interessierenden mRNA(s).

Zur Vermeidung von unspezifischem Priming und/oder Mispriming der non-mRNA-Templates werden in gängigen Verfahren zum Priming der reversen Transkription häufig handelsübliche oligo-dT-Primer verwendet, damit bevorzugt nur mRNAs revers transkribiert werden, die am 3'-Ende einen poly-A tail aufweisen. Dennoch werden trotz der Verwendung von oligo-dT-Primern, durch unspezifisches Priming und/oder Mispriming auch andere RNA-Typen, wie beispielsweise rRNA, tRNA, snRNA etc., bis zu einem gewissen Grad revers transkribiert, so dass auch hier häufig eine Verminderung der Empfindlichkeit der Downstream-Analysen der mRNAs nicht auszuschließen ist.

Diese unerwünschte reverse Transkription von non-mRNA-Templates, die nicht über einen poly-A tail verfügen, wird derzeit häufig toleriert, da alternative Verfahren zur Abreicherung

von beispielsweise rRNA, tRNA und snRNA Transkripten sehr aufwendig und kostenintensiv sind, zu einem Sequenz-Bias führen, und häufig schlechte Ausbeuten aufweisen.

Darüber hinaus erfordern viele Methoden zur Analyse von Genexpressionsmustern auf RNA Ebene, wie z. B. Array-Analysen, eine reverse Transkription der interessierenden mRNA mit einer anschließenden cDNA-Doppelstrangsynthese. Diese Doppelstrangsynthese ist notwendig, damit die so generierte doppelsträngige cDNA in einer nachfolgenden *in vitro* Transkription (IVT) amplifiziert und/oder gelabelt werden kann. Nach Beendigung dieser enzymatischen Reaktion enthält auch hier der Reaktionsansatz neben der synthetisierten ds-cDNA noch die eingesetzte total RNA sowie cDNA Einzelstränge, an denen keine Doppelstränge synthetisiert wurden. Diese verschiedenen einzelsträngigen Nukleinsäure Typen werden ebenfalls mit in die nachfolgende IVT sowie in den Hybridisierungsansatz auf dem Array „verschleppt“ und führen ebenfalls zur Verminderung der Signale auf dem Array.

Um die Sensitivität derartiger Applikationen zu erhöhen ist eine zusätzliche Aufreinigung von DNA mit gleichzeitiger Abreicherung von RNA erforderlich. Zu den derzeitigen Verfahren zur Abreicherung der RNA aus einer Probe, die beide Nukleinsäure-Typen enthält, zählt der Verdau mit RNase. Hierbei muss jedoch die RNase als separates Enzym für die Zweitstrangsynthese in einem zusätzlichen Pipetierschritt zugegeben werden, was derartige Verfahren sehr zeit- und kostenintensiv macht. Zudem kann die RNase nur teilweise wieder vollständig aus der Probe entfernen werden.

Zur Überwindung der aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile liegt der vorliegenden Erfindung die **A u f g a b e** zugrunde, ein effizientes Verfahren zur selektiven reversen Transkription und/oder Amplifikation der interessierenden Nukleinsäure(n) bereitzustellen, das die Herstellung einer hochreinen Nukleinsäure aus einer komplexen biologischen Probe bzw. einer enzymatischen Reaktion ermöglicht, die in einer gewünschten Downstream-Analyse möglichst sensitiv vermessen werden kann bzw. können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription eines Pools von Nukleinsäuren eines Typs (A) aus einer biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion **g e l ö s t**, gekennzeichnet durch die selektive Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure des Typs (A) und/oder die

selektive Unterdrückung der Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure des Typs (A).

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass durch die selektive Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure eine Typs (A), und/oder durch die selektive Unterdrückung der Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure eine Typs (A), welche in einem aus einer komplexen biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion stammenden Pool von Nukleinsäuren des Typs (A) vorliegt, bestimmte Nukleinsäuren des Typs (A) oder Amplifikationsprodukte dieser in hochreiner Form und frei von unerwünschten Nukleinsäuren des Typs (A) oder deren Amplifikationsprodukten separiert werden.

Biologischen Ausgangsmaterialien im Sinne der Erfindung sind komplexe biologischen Proben, wie beispielsweise Gewebeproben aus neuronalem, Leber- oder Muskelgewebe etc., isolierte Zellen (z. B. Leukozyten), Vollblut und/oder mit Vollblut kontaminierte Proben (z. B. Gewebeproben aus Blutgefäßen oder anderen stark durchbluteten Geweben) sowie andere biologische Materialien. Des weiteren fallen unter den Begriff biologischen Ausgangsmaterialien im Sinne der Erfindung ebenfalls die Produkte von enzymatischen Reaktionen, wie beispielsweise Produkte mindestens einer Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion (z. B. einer IVT).

Bei der Nukleinsäure des Typs (A) handelt es sich im Sinne der vorliegenden Erfindung um mRNAs, wobei diese natürliche oder aus *in vitro* Transkriptions-Reaktionen stammende mRNAs sein können. Ferner wird unter dem Begriff „unerwünschte Nukleinsäure des Typs (A)“ im Sinne der Erfindung mindestens eine mRNA verstanden, die jeweils einen Anteil von 20% oder mehr an der gesamt-mRNA ausmacht. Wie vorstehend bereits erwähnt können bestimmte unerwünschte mRNAs in Proben aus bestimmten Ausgangsmaterialien in sehr hohen Kopienzahlen vorhanden sein, wie etwa Globin-mRNAs in aus Vollblut isolierter RNA, Cytochrom-mRNAs in aus Muskelzellen isolierter RNA oder Myelin-mRNAs in aus neuronalem Gewebe isolierter RNA. Hier kann der Anteil dieser mRNA(s) auch mehr als 40% oder sogar mehr als 60% an der gesamt-mRNA ausmachen.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass das erfindungsgemäße Verfahren eine effiziente Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten

Nukleinsäure eine Typs (A), und/oder der Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure eine Typs (A), insbesondere von Globin-mRNA ermöglicht. Unabhängig davon, ob die Vollblutprobe zeitnah entnommen wurde, oder in einem Stabilisierungsreagenz aufgenommen und gelagert wurde.

Vorteilhafterweise werden die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Blutproben zur Erhaltung des RNA-Status unmittelbar bei der Abnahme in ein Stabilisierungsreagenz überführt. Als Stabilisierungsreagenzien können beispielsweise bekannte Verbindungen, wie Tetra-Alkyl-Ammoniumsalze in Gegenwart einer organischen Säure (WO 02/00599 / QIAGEN GmbH, Hilden, DE) oder Guanidin-Verbindungen in einer Mischung mit einer Puffersubstanz, einem Reduktionsmittel und/oder einem Detergenz (WO 01/060517 / Antigen Produktions GmbH, Stuttgart, DE) verwendet werden. Eine derartige Vorgehensweise ermöglichen Blutentnahmeröhrchen in denen das Stabilisierungsreagenz bereits enthalten ist (PaxGene / PreAnalytix, Hombrechticon, CH).

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens können zudem die einzelnen Verfahrensschritte unterschiedlich gestaltet werden. Aufgebaut wird das erfindungsgemäße Verfahren jedoch auf dem Verfahrensschritt a), der Durchführung einer reversen Transkriptions-Reaktion einer RNA aus einer biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion in Anwesenheit mindestens eines oligo-dT Primers. Optional können im Anschluss an a) die Verfahrensschritte b), die Durchführung einer cDNA-Zweitstrangsynthese, und c), die Aufreinigung der in b) gebildeten ds-cDNA unter gleichzeitiger Abreicherung aller einzelsträngigen Nukleinsäuren aus dem Reaktionsprodukt von b) durchgeführt werden. Ferner kann nach a) und/oder b) und/oder c) eine Amplifikation der cDNA durchgeführt werden.

Nach einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der erste Verfahrensschritt (a) nach im Stand der Technik an sich bekannten Methoden mit gängigen Reagenzien, wie beispielsweise einer handelsübliche Reversen Transkriptase (z. B. Superscript II RT / Invitrogen) sowie in Anwesenheit mindestens eines handelsüblichen oligo-dT Primers (T7-oligo-dT₂₄ Primer / Operon, Köln, DE), durchgeführt.

Wie bereits eingangs erwähnt, werden in gängigen Verfahren zur Verminderung der reversen Transkription der zum Typ (A) unterschiedlichen Nukleinsäuren zum Priming der reversen Transkription häufig handelsübliche oligo-dT-Primer oder Derivate und/oder Fusionen aus oligo-dT-Primern, wie beispielsweise Primer mit Sequenzen für einen T7-

RNA-Polymerase-Promotor am 5'-Ende und oligo-dT Sequenzen am 3'-Ende, verwendet, so dass bevorzugt nur mRNAs revers transkribiert werden, die am 3'-Ende eine poly-A Sequenz aufweisen. Dabei handelt es sich bei den zum Typ (A) unterschiedlichen Nukleinsäuren in Sinne der Erfindung im Wesentlichen um anderer RNA-Typen als mRNAs (z. B. rRNA, tRNA, snRNA, gDNA sowie plastidäre DNA), die sogenannten non-mRNA-Templates.

Im Anschluss an den Verfahrensschritt a) kann dann optional eine cDNA-Zweitstrangsynthese mit einer an sich bekannten Methode, inklusive der gängigen Reagenzien, durchgeführt werden. So wird beispielsweise vor dem Start der Zweitstrangsynthese eine RNase H als separates Enzym zugegeben, wobei die nach der Erststrangsynthese an die cDNA hybridisierte mRNA durch die Aktivität des Enzyms abgebaut wird (während die nicht als Hybrid vorliegende RNA nicht Substrat für die RNase H ist). Die Reaktion wird so durchgeführt, dass der RNase H-Verdau nur unvollständig abläuft, so dass kürzere RNA-Fragmente verbleiben. Diese RNA-Fragmente dienen als Primer für die nachfolgende Zweitstrangsynthese.

Zur Vermeidung von zusätzlichen Pipetierschritten sowie zur Einsparung von Material etc. wird in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens vorteilhafterweise eine spezifische Reverse Transkriptase (z. B. LabelStar RT / QIAGEN GmbH, Hilden, DE) eingesetzt, die über eine intrinsische Rnase H-Aktivität verfügt, so dass die cDNA-Zweitstrangsynthese wesentlich schneller, einfacher und kostengünstiger durchgeführt werden kann (s. Beispiel 1).

Nach Beendigung dieser enzymatischen Reaktion enthält der Reaktionsansatz üblicherweise neben der synthetisierten ds-cDNA auch noch die eingesetzte gesamt-RNA sowie cDNA Einzelstränge (z. B. ss cDNA, virale cDNA etc.), an denen keine Doppelstränge synthetisiert wurden (u. a. deswegen, weil die Synthese des Zweistrangs nicht mit 100%iger Effizienz geschieht). Diese verschiedenen Nukleinsäure-Typen werden ohne einen effektiven Reinigungsschritt auch in eine nachfolgende Amplifikationsreaktion und/oder damit in den Hybridisierungsansatz auf dem Array mit „verschleppt“. Während der Hybridisierung konkurrieren dort die verschiedenen in Lösung befindlichen unmarkierten Nukleinsäuren mit den markierten cRNA Transkripten um die Bindung an die Sonden auf dem Array. Weiterhin findet eine Kompetition der Sonden auf dem Array mit den in Lösung befindlichen unmarkierten Nukleinsäuretranskripten um die Bindung an die markierten

cRNAs statt. Da das Gleichgewicht dieser Wettbewerbsreaktionen nicht komplett auf Seite der Hybridisierung der markierten cRNAs an die Sonden auf dem Array liegt, führt die Gegenwart der unmarkierten Nukleinsäuren zur Verminderung der Signale auf dem Array.

Die ungewollte Hybridisierung eines oder mehrerer überrepräsentierter markierter oder unmarkierter Nukleinsäuretranskripte an die Sonden auf dem Array kann weiterhin vermindert werden durch die Zugabe von unmarkierten Oligonukleotiden, die die revers komplementäre Sequenz zu den unerwünschten Nukleinsäuretranskripten aufweisen. Bei diesen revers komplementären Oligonukleotiden kann es sich beispielsweise um *in vitro* transkribierte oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide handeln. Durch die daraus folgende Verminderung der unspezifischen Hybridisierung überrepräsentierter Transkripte wird eine Steigerung der Sensitivität der Array Analyse erzielt.

Zu Vermeidung des „Verschleppens“ der unterschiedlichen Nukleinsäure-Typen kann im Anschluss an Schritt b) eine konventionelle Aufreinigung des Reaktionsansatzes der enzymatischen Reaktion erfolgen. Der eigentliche Aufreinigungsschritt erfolgt beispielsweise durch den Einsatz von im Stand der Technik bekannten „Silica-Spin-Column Technologien“ (z. B. mit dem kommerziell erhältlichen GeneChip Sample Cleanup Module / Affymetrix, Santa Clara, US). Hierbei wird das Reaktionsgemisch nach der Zugabe eines chaotrope Salze enthaltenden Bindungspuffers zur Trennung über eine handelsübliche Spinsäule (z. B. MinElute Cleanup Kit / QIAGEN GmbH, Hilden, DE) gegeben. Da es jedoch hierbei vielfach zu Verunreinigungen des Eluats durch „verschleppte“ RNA aus der gesamt-RNA kommt, wird in gängigen Aufreinigungsverfahren zur Eliminierung der eingesetzte gesamt-RNA aus der Probe ein RNase-Verdau vorgeschaltet. Der RNase-Verdau ist jedoch durch das Mehr an Material und die zusätzlichen Arbeitsschritte sehr kosten- und zeitintensiv. Zudem kann die RNase nachfolgend nicht immer vollständig aus der Probe entfernt werden, was beispielsweise bei einer anschließenden Amplifikation, in der die Probe mit RNA in Kontakt gebracht wird, ungünstigerweise zur Degradation dieser RNA führt.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass der RNase-Verdau durch einen zusätzlichen Waschschrift im Anschluss an die Bindung der unterschiedlichen Nukleinsäuren an das Säulenmaterial überflüssig wird. So kann der erfindungsgemäße Verfahrensschritt c) nicht nur vorteilhafterweise eine vorgeschaltete Isolierung von mRNA ersetzen, sondern er ermöglicht gleichzeitig die Abreicherung aller einzelsträngigen Nukleinsäuren (ss DNAs und RNAs) aus dem Reaktionsprodukt aus Schritt b), unter Aufreinigung der ds-cDNA.

Ferner wird durch den Einsatz des erfindungsgemäßen Waschschriffs die Herstellung einer ds-cDNA mit einem hohen Reinheitsgrad ermöglicht, was zu einer enormen Steigerung der Empfindlichkeit in einer nachfolgenden GeneChip-Analyse führt (s. Beispiel 10).

Neben der Abreicherung einzelsträngiger RNA und cDNA kann durch Einsatz des erfindungsgemäßen Waschschriffs auch sequenzspezifisch mindestens ein einzelsträngiges Nukleinsäuretranskript von anderen einzelsträngigen Transkripten separiert werden. Hierbei werden die zur einzelsträngigen Zielsequenz revers komplementäre Oligonukleotide verwendet, die mit der Zielsequenz ein doppelsträngiges Nukleinsäurehybrid bilden. Bei anschließender Aufreinigung unter Einsatz des erfindungsgemäßen Waschschriffs werden alle nicht hybridisierten, und somit weiterhin einzelsträngigen Transkripte aus dem Nukleinsäuregemisch separiert.

Zur Aufreinigung der ds-cDNA werden gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren in Schritt c) zunächst die aus Schritt b) stammenden Nukleinsäuren in ihrer Gesamtheit an eine Silicamatrix gebunden und anschließend die Silicamatrix zur Abreicherung der einzelsträngigen Nukleinsäuren mit einem Guanidin-haltigen Waschpuffer gewaschen. Wurde bei der Durchführung der reversen Transkription der gesamt-RNA mit oligo-dT Primern geprimt, so wurden vorrangig cDNA Moleküle synthetisiert, die komplementär zu den mRNA Molekülen der Ausgangs-RNA sind (d. h. keine cDNA Synthese ausgehend von rRNA, tRNA, snRNA Molekülen). Nachdem die Reaktionslösung auf die Silica Spinsäulen gegeben wurde, oder zu dieser Silicapartikel hinzugegeben wurden, erlaubt nun das oben beschriebene Verfahren die Abreicherung aller einzelsträngigen Nukleinsäuren in einem Waschschrift mit einem erfindungsgemäßen Waschpuffer.

Vorteilhafterweise kann der erfindungsgemäße Waschschrift in jeglichen Verfahren Einsatz finden, in denen eine Aufreinigung doppelsträngiger Nukleinsäuren mit gleichzeitiger Abreicherung einzelsträngiger Nukleinsäuren gewünscht ist. So kann der erfindungsgemäße Waschschrift auch im Nachgang an den im Folgenden dargestellten optionalen Verfahrensschritt d) (der Durchführung einer Amplifikation der cDNA) erfolgen.

Die zur Aufreinigung verwendete Silicamatrix kann eine oder mehrere Silicamembran(en) oder Partikel mit einer Silicaoberfläche, insbesondere magnetische Silicapartikel, umfassen, und in einer Spinsäule oder anderen gängigen Vorrichtungen zur Nukleinsäureaufreinigung enthalten sein.

Der für den erfindungsgemäßen Waschschrift verwendete Guanidin-haltige Waschpuffer enthält bevorzugt Guanidinisothiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat, vorzugsweise in einer Konzentration von 1 M bis 7 M, besonders bevorzugt von 2,5 M bis 6 M und ganz besonders bevorzugt von 3 M bis 5,7 M. Als eine Alternative zu Guanidinisothiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat, kann erfindungsgemäß ebenso Guanidin Hydrochlorid, mit einer Konzentration von 4 M bis 9 M, vorzugsweise von 5 bis 8 M.

Als weitere Bestandteile kann der im erfindungsgemäßen Waschschrift eingesetzte Waschpuffer eine oder mehrere Puffersubstanz(en) in einer Gesamtkonzentration von 0 mM bis 40 mM und/oder ein oder mehrere Additiv(e) in einer Gesamtkonzentration von 0 mM bis 100 mM und/oder ein oder mehrere Detergenz(ien) in einer Gesamtkonzentration von 0 % (v/v) bis 20 % (v/v) enthalten.

Der pH-Wert des Waschpuffers liegt bevorzugt im Bereich von pH 5 bis 9, besonders bevorzugt im Bereich von pH 6 bis 8, wobei zur Einstellung des entsprechenden pH-Wertes gängige Puffersubstanzen (wie beispielsweise Tris, Tris-HCl, MOPS, MES, CHES, HEPES, PIPES und/oder Natriumcitrat), vorzugsweise mit einer Gesamtkonzentration der Puffersubstanzen 20 mM bis 40 mM, verwendet werden.

Ferner können abhängig von den einzelnen Reaktionsbedingungen weitere geeignete Additive, wie beispielsweise Chelatbildner (z. B. EDTA, EGTA oder andere geeignete Verbindungen) und/oder Detergentien (z. B. Tween 20, Triton X 100, Sarcosyl, NP40 etc.) der Waschpufferzusammensetzung hinzugefügt werden.

Die folgende Aufstellung zeigt bevorzugte Zusammensetzungen des im erfindungsgemäßen Waschschrift verwendeten Waschpuffers:

- Waschpuffer 1: 3,5 M Guanidinisothiocyanate *
25 mM Natrium Citrat, pH 7,0
- Waschpuffer 2: 5,67M Guanidinisothiocyanate *
40 mM Natrium Citrat pH 7,5

- Waschpuffer 3: 5,0M Guanidinisoithiocyanate *
35 mM Natrium Citrat pH 7,5
- Waschpuffer 4: 4,5 M Guanidinisoithiocyanate *
32 mM Natrium Citrat pH 7,5
- Waschpuffer 5: 4,0 M Guanidinisoithiocyanate *
28 mM Natrium Citrat pH 7,5
- Waschpuffer 6: 3,5 M Guanidinisoithiocyanate *
25 mM Natrium Citrat pH 7,5
- Waschpuffer 7: 4,5 M Guanidinisoithiocyanate *
0,1 M EDTA, pH 8,0
- Waschpuffer 8: 7,0 M Guanidin Hydrochloride, pH 5,0
- Waschpuffer 9: 5,6 M Guanidin Hydrochloride
20% Tween-20

* Guanidinthiocyanate kann hierbei in Kombination mit oder anstelle von Guanidinisoithiocyanate verwendet werden.

Der vorstehend beschriebene Einsatz des erfindungsgemäßen Waschschriffs kann somit zur Abreicherung von rRNA aus doppelsträngigen eukariontischen cDNA Syntheseprodukten Anwendung finden. Eine weitere Applikation ist die Separation einzelsträngiger viraler Nukleinsäuren von eukariontischer oder prokaryontischer, doppelsträngiger genomischer DNA (s. Beispiel 4).

Wie bereits erwähnt, ist der erfindungsgemäße Waschschrift zur Abreicherung einzelsträngiger Nukleinsäuren von doppelsträngigen Nukleinsäuren für diverse Downstream-Analysen vorteilhaft. So könnten neben Array-Analysen auch die Sensitivitäten beispielsweise in Amplifikationsreaktionen oder anderen Anwendungen (wie beispielsweise Ribonuklease Protection Assays, Northern oder Southern Blot Analysen, Primer Extension Analysen etc.) gesteigert werden.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass einerseits bereits die Durchführung einzelner Verfahrensschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens die Reinheit der aus den unterschiedlichen Proben gewonnenen interessierenden Nukleinsäure verbessert, andererseits jedoch insbesondere die Kombination einzelner Verfahrensschritte in unterschiedlicher Art und Weise synergetische Effekte erzeugt, die zur Herstellung mindestens einer hochreinen Nukleinsäure des Typs (A) beiträgt.

Neben der Erhöhung der Spezifität durch spezifisches Priming von cDNA-Synthesen mit einer entsprechenden Reversen Transkriptase, kann eine ungewollt hohe Anzahl vorhandener mRNA-Transkripte, wie beispielsweise Globin-mRNA-Transkripte aus einer Vollblutprobe, von nachfolgenden Downstream-Analysen auch durch die Anwesenheit einer Molekül-Spezies zur Unterdrückung einer RT- und/oder Amplifikationsreaktion der ungewünschten mRNA Transkripte eliminiert werden.

So können gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Verfahrensschritte a) und/oder d) in Anwesenheit mindestens einer Molekül-Spezies zur selektiven Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten mRNA und/oder zur selektiven Unterdrückung der Amplifikation der aus der/den unerwünschten mRNA(s) hergestellten einzel- oder doppelsträngigen cDNA(s), durchgeführt werden.

Im Verfahrensschritt a) binden die Molekül-Spezies an die unerwünschten Nukleinsäuren des Typs (A) oder spalten diese, um dadurch die reverse Transkription der unerwünschten mRNAs zu verhindern.

Unter Amplifikation im Sinne der Erfindung werden verschiedenen Reaktionstypen, wie beispielsweise eine *in vitro* Transkription, eine Polymerase Chain Reaction (PCR), eine Ligase Chain Reaction (LCR), eine Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) oder eine self-sustained Sequence Replication (3SR) etc. verstanden.

Je nach Art der biologischen Probe oder des enzymatischen Reaktionsproduktes kann es von Vorteil sein, die Molekül-Spezies sowohl im Verfahrensschritt a), als auch nachfolgend im Verfahrensschritt d) einzusetzen. Dabei können die eingesetzten Molekül-Spezies in allen Verfahrensschritten gleich oder unterschiedlich sein.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher der Verfahrensschritt a) in Anwesenheit mindestens einer Molekül-Spezies zur selektiven Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten mRNA durchgeführt, wobei die reverse Transkription der überrepräsentierten Transkripte durch Binden der Molekül-Spezies an diese mRNAs unterbrochen wird. Somit stehen diese Transkripte für das cDNA Labeling, die Doppelstrangsynthese und/oder die nachfolgende Amplifikation nicht mehr zur Verfügung.

Molekül-Spezies im Sinne der Erfindung können zur mRNA oder zu einem der cDNA-Stränge komplementäre DNA- oder RNA-Oligonukleotide (antisense-Oligonukleotide) oder deren Derivate, z. B. Oligonukleotide, enthaltend modifizierte oder artifizielle Nukleotide, Quencher, Fluorophore oder andere Modifikationen, in einer Länge von 10 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise 12 bis 30 Nukleotiden sein.

Zusätzlich können die Molekül-Spezies ein zur mRNA oder zu einem der cDNA-Stränge komplementäres Nukleinsäure-Analogon sein, wobei als Nukleinsäure-Analogon auch modifizierte Nukleinsäuren, wie PNAs (peptide nucleic acids), LNA (locked nucleic acids), und/oder GripNAs verwendet werden können. Hierbei bindet die Molekül-Spezies, welche zum sequenz-spezifischen Blocken eingesetzt wird, vorzugsweise in der 3'-Region der zu blockierenden Nukleinsäure (der mRNA oder einem der cDNA-Stränge).

Als bevorzugte Molekül-Spezies werden PNAs die eine Länge von 12 bis 20 Nukleotidanaloga, vorzugsweise von 13 bis 16 Nukleotidanaloga aufweisen (PE Biosystems, Weiterstadt, DE) und/oder GripNAs, die eine Länge von 12 bis 30 Nukleotidanaloga, vorzugsweise von 14 bis 20 Nukleotidanaloga aufweisen (ActiveMotif), und/oder LNAs, die mindestens ein Nukleotid aufweist, welches ein 'locked nucleotide' ist, und die eine Länge von 14 bis 30 Nukleotide, vorzugsweise von 15 bis 22 Nukleotide, aufweisen (Operon, Köln, DE), verwendet.

Alternativ zur Nutzung eines einzigen Moleküls zur Sequenz-spezifischen Blockierung einer spezifischen Zielsequenz können auch mehrere Moleküle komplementär zu verschiedenen Regionen innerhalb einer oder mehrerer spezifischen Zielsequenz(en) eingesetzt werden. Weiterhin kann es sich auch als vorteilhaft erweisen, ein einziges Molekül zur Sequenz-spezifischen Blockierung einzusetzen, welches gegen mehrere unterschiedliche Ziel-RNAs

oder Ziel-cDNAs gerichtet ist, wenn das Molekül komplementär zu einer homologen Region verschiedener Ziel-RNAs oder Ziel-cDNAs ist.

Wenn die Molekül-Spezies, welche zum sequenzspezifischen Blocken eingesetzt wird, beispielsweise zur Verhinderung einer Nukleinsäure-Polymerisation (z. B. einer RT) eingesetzt wird, muss diese Molekül-Spezies an ihrem 3'-Ende eine Modifikation aufweisen (z. B. durch Acetylierung, Phosphorylierung, Carboxylierung oder andere geeignete Modifikationen), die verhindern, dass die Molekül-Spezies nicht selbst als Primer dienen und folglich eine Elongation beginnend am 3'-Ende der Molekül-Spezies initialisieren. In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung wird das Markieren von RNA durch die Hybridisierung der RNA mit fest bindenden Molekülen verhindert.

Alternativ zum Blockieren der Zielsequenz gibt es, wie eingangs bereits erwähnt, auch die Möglichkeit, bestimmte ungewollte bzw. unerwünschte mRNAs mittels bestimmter Molekül-Spezies sequenzspezifisch zu spalten. Zu diesem Zweck können Molekül-Spezies wie beispielsweise DNAzyme, Ribozyme, insbesondere hammerhead ribozymes und/oder hairpin ribozymes, eingesetzt werden. Diese Moleküle sind vorzugsweise gegen die 3'-Region der ungewollten RNA gerichtet und werden vor Durchführung der reversen Transkription eingesetzt. Für diese Ausführungsform der Erfindung können Ribozyme bestehend aus RNA oder RNA-Derivaten oder Fusionsprodukte solcher Ribozyme eingesetzt werden. Die komplementäre Sequenz der Ribozyme weist vorzugsweise eine Länge von 12 bis 30 Nukleotiden, besonders bevorzugt eine Länge von 15 bis 25 Nukleotiden, auf.

Vorteilhafterweise werden als Molekül-Spezies zur selektiven Unterdrückung bzw. zur Blockierung der reversen Transkription oder Amplifikation der unerwünschten mRNA, insbesondere der Globin-Sequenzen, erfindungsgemäß ein(e) oder mehrere DNA-Oligonukleotid(e), PNA(s) und/oder LNA(s), welche die im Folgenden aufgeführten Sequenzen aufweisen, eingesetzt.

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um ein DNA-Oligonukleotid, und ist die Globin-mRNA eine alpha 1-Globin-mRNA und/oder eine alpha 2-Globin-mRNA, weist das DNA-Oligonukleotid zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungs-

gemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner alpha 1-Globin-mRNA und / oder alpha 2-Globin-mRNA ist.

alpha_473: 5'CTC CAG CTT AAC GGT - Phosphatgruppe - 3'
 alpha_465: 5'TAA CGG TAT TTG GAG - Phosphatgruppe - 3'
 alpha_465_long: 5' TAA CGG TAT TTG GAG GTC AGC ACG GTG CTC
 - Phosphatgruppe - 3'

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um ein DNA-Oligonukleotid, und ist die Globin-mRNA eine beta Globin-mRNA, weist das DNA-Oligonukleotid zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungsgemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner beta Globin-mRNA ist.

beta_554: 5'GTA GTT GGA CTT AGG - Phosphatgruppe - 3'
 beta_594: 5'ATC CAG ATG CTC AAG - Phosphatgruppe - 3'
 beta_554_long: 5'GTA GTT GGA CTT AGG GAA CAA AGG AAC CTT
 - Phosphatgruppe - 3'

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um eine PNA, und ist die Globin-mRNA eine alpha 1-Globin-mRNA und/oder eine alpha 2-Globin-mRNA, weist die PNA zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungsgemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner alpha 1-Globin-mRNA und / oder alpha 2-Globin-mRNA ist.

alpha_473: N- CTC CAG CTT AAC GGT -C*
 alpha_465: N- TAA CGG TAT TTG GAG -C*
 alpha_363: N- GTC ACC AGC AGG CA -C*
 alpha_393: N- GTG AAC TCG GCG -C*
 alpha_473**: N- TGG CAA TTC GAC CTC -C*
 alpha_465**: N- GAG GTT TAT GGC AAT -C*
 alpha_363**: N- ACG GAC GAC CAC TG -C*
 alpha_393**: N- GCG GCT CAA GTG -C*

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um eine PNA, und ist die Globin-mRNA eine beta Globin-mRNA, weist die PNA zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungsgemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner beta Globin-mRNA ist.

beta-554: N- GTA GTT GGA CTT AGG -C*
beta-594: N- ATC CAG ATG CTC AAG -C*
beta-539: N- CCC CAG TTT AGT AGT -C*
beta-541: N- CAG TTT AGT AGT TGG -C*
beta-579: N- GCC CTT CAT AAT ATC -C*
beta-554**: N- GGA TTC AGG TTG ATG -C*
beta-594**: N- GAA CTC GAT GAC CTA -C*
beta-539**: N- TGA TGA TTT GAC CCC -C*
beta-541**: N- GGT TGA TGA TTT GAC -C*
beta-579**: N- CTA TAA TAC TTC CCG -C*

Wobei N den Aminoterminus der Oligomere und C* den Carboxyterminus der Oligomere angibt, und die mit den (**) versehenen Sequenzen zu den vorstehenden Sequenzen revers-orientiert sind.

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um eine LNA, die mindestens ein Nukleotid aufweist, welches ein 'locked nucleotide' ist, und ist die Globin-mRNA eine alpha 1-Globin-mRNA und/oder eine alpha 2-Globin-mRNA, weist die LNA zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungsgemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner alpha 1-Globin-mRNA und / oder alpha 2-Globin-mRNA ist.

alpha_473: 5'CTC CAG CTT AAC GGT - Oktandiol - 3'
alpha_465: 5'TAA CGG TAT TTG GAG - Oktandiol - 3'
alpha_363: 5' GTC ACC AGC AGG CA - Oktandiol - 3'
alpha_393: 5' GTG AAC TCG GCG - Oktandiol - 3'

Handelt es sich bei der Molekül-Spezies um eine LNA, die mindestens ein Nukleotid aufweist, welches ein 'locked nucleotide' ist, und ist die Globin-mRNA eine beta Globin-

mRNA, weist die LNA zur Blockierung der reversen Transkription von Globin-mRNA erfindungsgemäß eine Sequenz aus der folgenden Gruppe auf, die komplementär zu humaner beta Globin-mRNA ist.

beta-554: 5' GTA GTT GGA CTT AGG - Oktandiol - 3'

beta-594: 5' ATC CAG ATG CTC AAG - Oktandiol - 3'

beta-539: 5' CCC CAG TTT AGT AGT - Oktandiol - 3'

beta-541: 5' CAG TTT AGT AGT TGG - Oktandiol - 3'

beta-579: 5' GCC CTT CAT AAT ATC - Oktandiol - 3'

Dabei können in den genannten LNA-Sequenzen einzelne oder alle Positionen in den Oligonukleotiden mit den sogenannten „locked nucleotides“ substituiert sein können. Bei diesen „locked nucleotides“ handelt es sich vornehmlich um enzymatisch nicht abbaubare Nukleotide, die jedoch einer Polymerase nicht als Startmolekül dienen können, da sie kein freies 3'-OH-Ende aufweisen.

Werden RNA Präparationen, die einen hohen Anteil überrepräsentierter Transkripte (z. B. Globin-mRNA Transkripte) aufweisen, in Anwesenheit der vorstehend dargestellten Molekül-Spezies revers transkribiert und/oder die Produkte der reversen Transkription amplifiziert (vorzugsweise durch eine *in vitro* Transkription, optional mit einem anschließenden DNase-Verdau sowie einer cRNA Aufreinigung), und/oder wird zumindest ein erfindungsgemäßer Waschschriff durchgeführt, liegen vorteilhafterweise keine RT-Produkte oder daraus hervorgegangenen Amplifikationsprodukte vor, wodurch die Sensitivität der Gen-Expressions-Analyse niedrig oder niedriger exprimierter Transkripte wesentlich erhöht werden kann.

Insbesondere der Einsatz der aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierenden cRNA und/oder cDNA in einer Array-basierenden Gen-Expressions-Analyse ist äußerst vorteilhaft, da keine RT-Produkte hervorgegangen aus hochexprimierten Transkripte und / oder Amplifikationsprodukte aus RT-Produkten hochexprimierter Transkripte auf den Arrays hybridisiert werden und somit eine Verminderung der Signalintensitäten sowie der damit verbundene Verlust an Sensitivität in der Array-Analyse vermieden wird.

Nachfolgend soll nun die vorliegende Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen sowie der nachstehenden Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Es zeigt:

Fig. 1 den Einfluss verschiedener Endkonzentrationen von alpha_465 und beta_554 PNAs auf die Generierung von cRNAs als bildliche Darstellung der cRNA-Analyse auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer wie auf einem Gel, mit:

- Bande L: RNA-Größenstandard,
- Bande 1: generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 10 μM ,
- Bande 2: generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 1,0 μM ,
- Bande 3: generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,1 μM ,
- Bande 4: generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,01 μM ,
- Bande 5: generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,001 μM
- Bande 11: generierte cRNA ohne Zugabe von PNAs (Vergleichsprobe).

Fig. 2 den Einfluss verschiedener Endkonzentrationen von alpha_465 und beta_554 PNAs auf die Generierung von cRNAs. Dargestellt als elektropherographische Abbildung der cRNA-Analyse auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer, mit den Kurven:

- Türkis (1): generierte cRNA ohne Zugabe von PNAs (Vergleichsprobe)
- Gelb (2): generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,001 μM .
- Pink (3): generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,01 μM .
- Braun (4): generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 0,1 μM .
- Dunkelblau (5): generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 1,0 μM .
- Grün (6): generierte cRNA bei einer PNA Endkonzentration von jeweils 10 μM .

Fig. 3 die Korrelation der Signalintensitäten der Probe, in der nur Jurkat RNA verwendet wurde, mit denjenigen der Probe, in der Jurkat RNA mit zugesetzten Globin *in vitro* Transkripten analysiert wurde.

Fig. 4 die RNA Menge einer Probe vor und nach der Aufreinigung mit verschiedenen Waschbedingungen.

Fig. 5 Menge an einzelsträngiger cDNA einer Probe vor und nach der Aufreinigung mit verschiedenen Waschbedingungen.

Fig. 6 die Anwesenheit von RNA und gDNA vor und nach der Aufreinigung (mit verschiedenen Waschbedingungen) auf einem Formaldehyd-Agarosegel, wobei:

- Bande 1: die genomische DNA (vor dem Cleanup);
- Bande 2: die RNA (vor dem Cleanup);
- Bande 3: die genomische DNA gemischt mit der RNA (vor dem Cleanup);
- Bande 4 und 5: die genomische DNA gemischt mit der RNA (nach dem Cleanup);
(die Aufreinigung erfolgte unter Standardbedingungen mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer)
- Bande 6 und 7: die genomische DNA gemischt mit der RNA (nach dem Cleanup);
(die Aufreinigung erfolgte unter Standardbedingungen mit einem zusätzlichen Waschschriff mit einem chaotropen Salze enthaltenden Waschpuffer 1)

zeigt.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Isolation Kit (PreAnalytix, Hombrechtikon, CH) wurde RNA aus humanem Vollblut isoliert. Nachfolgend wurde eine Gen-Expressions-Analyse unter Verwendung der Affymetrix U133A GeneChips durchgeführt. Die Target Präparation erfolgte gemäß dem „Expression Analysis Technical Manual“ für Affymetrix GeneChip Analysen (Affymetrix, Santa Clara, US). Es wurden in zwei Ansätzen jedoch zwei verschiedene reverse Transkriptasen verwendet.

Ansatz 1: erfolgte gemäß dem Affymetrix "Expression Analysis Technical Manual" mit der Superscript II RT (Invitrogen) als reverse Transkriptase; und

Ansatz 2: erfolgte ebenfalls gemäß dem Affymetrix "Expression Analysis Technical Manual", jedoch mit 1 μ l der LabelStar RT (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) als reverse Transkriptase. Zudem wurde zusätzlich der zur LabelStar RT gehörende Reaktionspuffer für die cDNA-Zweitstrangsynthese verwendet.

Pro Ansatz wurden 6 μ g der isolierten RNA ausgehend von einem oligo-dT-T7 Primer (Operon, Köln, DE) revers transkribiert. Die cDNA Zweitstrang Synthese sowie alle weiteren Schritte der Probenvorbereitung für die GeneChip Analyse wurden ebenfalls nach Anleitung des Affymetrix „Expression Analysis Technical Manual“ durchgeführt, wobei die beiden verschiedenen Ansätze identisch behandelt wurden. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung der Proben auf Affymetrix U133 A GeneChips. Zum Vergleich der Ergebnisse der beiden Ansätze, wurden beide Arrays mit den gleichen Signalintensitäten auf TGT = 1000 skaliert.

Danach wurden beide Ansätze mit dem cDNA Cleanup des GeneChip Sample Cleanup Modules AHx gemäß dem Technical Manual des Herstellers bearbeitet (weitere Informationen s. Beispiel 12).

Die nachstehend in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung der LabelStar Reversen Transkriptase (spezifisches Priming der cDNA Synthese) der Anteil der als „present“ gewerteten Gene auf dem Gen Chip von 34,7% auf 39% (um 12%) anstieg.

	Prozent der "Positivmatches" ("present calls")	Scaling Faktor (TGT = 1000)	Normalisierte Signalintensität 18S rRNA	Normalisierte Signalintensität 28S rRNA
Probe mit Superscript RT	34,70	72,37	7.881,75	9636,21
Probe mit LabelStar RT	39,00	47,80	643,41	3245,78

Tabelle 1: Ergebnisse eine GeneChip-Analyse auf U133A GeneChips unter Verwendung unterschiedlicher reverser Transkriptasen.

Durch Verwendung der LabelStar Reversen Transkriptase für die Erststrangsynthese der cDNA konnten die Signalintensitäten für die ribosomalen RNA-Transkripte (18S rRNA und 28S rRNA) stark verringert werden. Somit ist das Priming mit der LabelStar RT als reversen Transkriptase wesentlich spezifischer für mRNA.

Diese Abreicherung der rRNAs bedingt ferner einen niedrigeren Scaling Faktor sowie eine höhere Rate an „present calls“ auf dem Array. (Der Scaling Faktor ist für die Probe mit der LabelStar RT Reversen Transkriptase um ca. 50% niedriger als bei der Probe, die mit der SuperScript revers transkribiert wurde.)

Beispiel 2:

RNA wurde aus humanem Vollblut isoliert. Die nachfolgende cDNA Synthese wurde wie in Beispiel 1 mit zwei verschiedenen Reversen Transkriptasen (SuperScript RT und LabelStar RT) ausgehend von oligo-dT-T7 Primern durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Zweitstrangsynthese unter identischen Bedingungen für die verschiedenen Ansätze. Nach Aufreinigung der Reaktionen erfolgte eine IVT mit anschließender Aufreinigung der cRNA inklusive eines DNase Verdau. Der DNase Verdau gewährleistet, dass in der nachfolgenden TaqMan RT-PCR Analyse (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) der cRNA ausschließlich die generierte RNA, und nicht die kontaminierende cDNA gemessen wird.

Im Anschluss daran wurden zwei verschiedene TaqMan RT-PCR Analysen durchgeführt:

- Quantifizierung der 18S rRNA
- Quantifizierung der p16 mRNA (exemplarisch für alle mRNA Transkripte)

Es zeigte sich, dass beim Einsatz der LabelStar RT die quantifizierte Menge an 18S rRNA etwa 8-fach niedriger war, als bei Verwendung der Superscript RT. Die Menge an quantifizierter p16 mRNA hingegen ist für beide Reverse Transkriptasen vergleichbar.

Daraus ergibt sich, dass durch die Verwendung der LabelStar RT die rRNA spezifisch abgereichert wird, während die mRNA Transkripte mit identischer Effizienz revers transkribiert werden.

Beispiel 3:

Die RNA eines Blutspenders wurde wie in Beispiel 1 unter Verwendung des PAXgene Blood RNA Systems (PreAnalytix, Hombrechticon, CH) isoliert. In Vorbereitung der anschließenden Affymetrix GeneChip Analyse wurde die Affymetrix Target Präparation nach Angaben des Affymetrix „Expression Analysis Technical Manual“ durchgeführt (Standard Protokoll). Dieser Ansatz wurde mit einem zweiten Ansatz verglichen, bei dem die Bedingungen während des Annealing des cDNA Primers variiert wurden:

Bedingungen zum Annealing des cDNA Primer Annealing:

- Standard Protokoll:
 - Inkubation für 10 min bei 70°C
 - Schnelles Abkühlen auf Eis
 - Nachfolgend cDNA Synthese bei 42°C
- Vergleichsansatz:
 - Inkubation für 10 min bei 70°C
 - Inkubation für 5 min bei 45°C
 - Inkubation für 2 min bei 42°C
 - Nachfolgend cDNA Synthese bei 42°C

Die anschließende GeneChip-Analyse auf Affymetrix U133A Gen Chips zeigte folgende in der Tabelle 2 aufgeführten Ergebnisse:

(Skalierung der Signalintensitäten auf TGT = 1000):

	Normalisierte Signalintensität 18S rRNA	Normalisierte Signalintensität 28S rRNA
Standard Protokoll	6114	3372
Vergleichsansatz	2437	2135

Tabelle 2: Ergebnisse eine GeneChip-Analyse auf U133A GeneChips

Die geänderten Bedingungen während der Anlagerung des cDNA Primers führen zu reduzierten Signalintensitäten für die ribosomalen RNAs.

Beispiel 4:

Die RNA eines Blutspenders wurde wie in Beispiel 1 unter Verwendung des PAXgene Blood RNA Systems (PreAnalytix, Hombrechticon, CH) isoliert. Zum Blockieren der reversen Transkription der Globin Transkripte (mRNAs) wurden die folgenden PNA-Sequenzen (PE Biosystems) hinzugefügt, die komplementär zu den 3'-Regionen der Globin Transkripte sind.

PNA-Sequenz, komplementär zu humaner alpha 1-Globin-mRNA und alpha 2-Globin-mRNA:

alpha_465: N- TAA CGG TAT TTG GAG -C*

PNA-Sequenz, komplementär zu humaner beta Globin-mRNA:

beta_554: N- GTA GTT GGA CTT AGG -C*

Pro Ansatz wurden 5 µg RNA in eine Reverse Transkription eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde gemäß den Herstellerangaben im Technical Manual (Affymetrix "Expression Analysis Technical Manual") durchgeführt, wobei zusätzlich die oben aufgeführten, zu den alpha und beta Globin Transkripten komplementären, PNA-Sequenzen zugefügt wurden. Vor dem Start der cDNA Synthese wurden beide PNAs (alpha_465 and beta_554) und die Primer in einem herkömmlichen cDNA Synthesereaktionspuffer (Puffer der Superscript RT / Invitrogen) für 10 min bei 70°C und nachfolgend für 5 min bei 42°C inkubiert. Vor Zugabe der Reversen Transkriptase wurden die PNAs in einer Endkonzentration von 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1,0 µM und 10 µM zugesetzt. Nachfolgend wurden alle weiteren für die RT benötigten Komponenten (wie zusätzliche Reaktionspuffer, Nukleotide, Dithiothreitol (DTT) und die reverse Transkriptase) zugegeben und die Proben für 1h bei 42°C inkubiert. Sowohl die cDNA Doppelstrang-Synthese, als auch die *in vitro* Transkription und das Cleanup der cRNA wurden gemäß der Herstellerangaben im Affymetrix "Expression Analysis Technical Manual" durchgeführt. Die Vergleichs- bzw. Kontrollproben ohne PNAs wurden dabei identisch behandelt.

Nach dem Cleanup der cRNA wurden die Proben auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Böblingen, DE) analysiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind den Figuren 1 und 2 zu entnehmen. Sie zeigen den Einfluss von alpha_465 und beta_554 PNAs auf die Generierung von cRNAs, wobei zudem deutlich wird, dass die Zugabe von zu alpha und beta

Globin Transkripten komplementären PNA Oligomeren zu einer Reduktion der cRNA Fragmente führt, welche eine deutliche Bande bei der Analyse auf dem Agilent 2100 Bioanalytiker ergeben. Diese cRNA Fragmente wurden aus den Globin Transkripten (mRNA) der Ausgangsmaterialien (Vollblut) generiert. Das Ausmaß der Reduktion ist dabei von der Konzentration der PNAs abhängig.

Beispiel 5:

Die RNA eines Blutspenders wurde wie in Beispiel 1 unter Verwendung des PAXgene Blood RNA Systems (PreAnalytix, Hombrechtikon, CH) aus humanem Vollblut (ohne Erythrozytenlyse) isoliert. Pro Ansatz wurden 1,7 µg RNA in eine Reverse Transkription eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde mit der reversen Transkriptase Omniscript (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) gemäß den Herstellerangaben (ausgenommen dessen, dass die RT bei 42°C anstatt bei 37°C erfolgte) durchgeführt. Geprimt wurde die cDNA-Synthese mit einem T7-oligo-dT₂₄ Primer (Operon, Köln, DE). Vor Zugabe der Reversen Transkriptase wurden PNAs (Sequenzen s. u.) in einer Endkonzentration von 0,5 µM, 1,0 µM und 1,5 µM zugesetzt und der Ansatz zuerst 10 min bei 70°C und dann 5 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Reverse Transkriptase zugegeben und die Proben für 1h bei 42°C inkubiert. Die Vergleichs- bzw. Kontrollproben ohne PNAs wurden dabei identisch behandelt.

Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden TaqMan-PCR-Reaktionen durchgeführt, bei denen die Menge an alpha und beta Globin cDNA anhand einer Standardreihe quantifiziert wurden.

Für die Amplifikation von alpha 1-Globin cDNA-Transkripte und alpha 2-Globin cDNA-Transkripte wurden identische Primer verwendet. Zur Blockierung der reversen Transkription der alpha und beta Globin Transkripte wurden die folgenden PNA-Sequenzen verwendet:

Sequenzen, die komplementär zu humaner alpha 1-Globin-mRNA und alpha 2-Globin-mRNA sind:

alpha_473: N- CTC CAG CTT AAC GGT -C*

alpha_465: N- TAA CGG TAT TTG GAG -C*

Sequenzen, die komplementär zu humaner beta Globin-mRNA sind:

beta_554: N- GTA GTT GGA CTT AGG -C*

beta_594: N- ATC CAG ATG CTC AAG -C*

Proben Nr.:	Eingesetzte PNA- Sequenz	Ermittelte Menge an alpha Globin cDNA (ng) (quantifiziert durch TaqMan PCR)			Ermittelte Menge an beta Globin cDNA (ng) (quantifiziert durch TaqMan PCR)		
		818			499		
		PNA Endkonzentration			PNA Endkonzentration		
		0,5 μ M	1,0 μ M	1,5 μ M	0,5 μ M	1 μ M	1,5 μ M
2	alpha_473	15,22	3,76	12,56	503,8	95,54	8,74
3	alpha_465	11,71	25,74	15,71	211,35	547,98	236,42
4	beta_554	766,09	322,24	432,33	2,46	0,38	0,96
5	beta_594	851,58	319,73	844,94	103,92	16,35	252,39

Tabelle 3: Einfluss von zu alpha und beta Globin komplementären PNAs auf eine Two-step RT-PCR Reaktion.

Die in Tabelle 3 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz der PNAs alpha_473 und/oder alpha_465 zur Reduktion der cDNA Menge der alpha Globin Transkripte um mehr als 95 % führt. Der Transkriptspegel an beta Globin bleibt beim Einsatz des PNA alpha_473 unbeeinflusst, wenn die PNA Endkonzentration nicht höher als 0,5 μ M ist.

Die Verwendung der PNAs beta_554 und beta_594 führt zur Reduktion der cDNA Menge an beta Globin um ca. 99 % bzw. 80 %. Werden diese PNAs in einer Endkonzentration von 0,5 μ M verwendet, bleibt der Transkriptspegel für alpha Globin unbeeinflusst.

Beispiel 6:

Von zwei verschiedenen Blutspendern wurde RNA mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Systems (PreAnalytix, Hombrechticon, CH) isoliert. Für die nachfolgende Gen-Expressions-Analyse mit Affymetrix U133A Gen Chips erfolgte für die RNA Proben beider Spender die Target Präparation mit folgenden Protokollvarianten:

1. Standardprotokoll (nach Affymetrix Expression Analysis Technical Manual)
2. Target Präparation unter Einsatz von PNAs zur Blockierung der reversen Transkription der Globine:

Im Vergleich zum Standardprotokoll wurden bei den Ansätzen unter Verwendung der PNAs folgende Protokolländerungen durchgeführt:

Die PNAs wurden vor der cDNA Synthese gemeinsam mit dem T7-Oligo(dT)₂₄ Primer (Operon, Köln, DE) zur RNA pipettiert. Zum Anlagern des Primers und der PNAs an die RNAs erfolgten mehrere Inkubationsschritte (10 min 70°C; 5 min 45°C; 2 min 42°C). Alle weiteren Schritte wurden wie im Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurden Ansätze unter Verwendung verschiedener PNA Kombinationen und PNA Konzentrationen miteinander verglichen.

Für jede der gesamt-RNA-Isolate wurden folgende PNA Kombinationen und PNA Endkonzentrationen (während der Annealingreaktion) eingesetzt:

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
alpha 465	300 nM	150 nM	300 nM
beta 594	1 μ M	500 nM	1 μ M
beta 579	1 μ M	500 nM	1 μ M
beta 539	1 μ M	-	-
beta 554	-	500 nM	1 μ M

Tabelle 4: PNA Kombinationen und Endkonzentrationen

Nach erfolgter Target Präparation erfolgte die Gen-Expressions-Analyse mit Hilfe von Affymetrix U133A Arrays. Zur Auswertung wurden alle Array Daten auf Signalintensitäten von TGT= 500 skaliert.

	present calls (%)	Signalintensitäten alpha 1 Globin und alpha 2 Globin						Signalintensitäten beta Globin		
Affymetrix annotation		2040 18_x _at	2094 58_x _at	2116 99_x _at	2117 45_x _at	2144 14_x _at	2174 14_x _at	2091 16_x _at	2116 96_x _at	2172 32_x _at
Spender 1:										
Standard- protokoll	31,8	1731 15	1605 33	1675 14	1864 44	1095 76	1547 82	1448 99	1404 89	1344 03
PNA Mix 1	37,2	1068 48	1025 42	9621 0	1134 68	6895 7	9962 3	6337 3	7149 2	6225 3
PNA Mix 2	39,8	1310 20	1283 60	1173 55	1416 99	9928 4	1214 70	7209 2	8834 0	7597 6
PNA Mix 3	42,6	1000 71	9602 4	8887 7	1105 23	7017 0	9365 8	5745 0	6421 9	5653 5
Spender 2										
Standard- protokoll	32,1	2219 61	2062 04	2048 30	2476 99	1373 76	1970 36	1651 18	1639 19	1636 78
PNA Mix 1	41,4	1149 30	1149 65	9694 1	1198 36	8040 5	1007 53	5624 9	6436 2	5709 8
PNA Mix 2	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PNA Mix 3	43,1	1136 70	1092 40	9287 7	1169 41	7798 1	1007 94	6460 7	6787 7	6449 8

Tabelle 5: Auswertung alle Array Daten nach erfolgter Gen-Expressions-Analyse auf Affymetrix U133A Arrays

Durch die Verwendung der PNAs konnten die Globin Signalintensitäten auf den Arrays um 40 - 60% gesenkt werden. Weiterhin wurde der Anteil der Gene, die auf dem Array als „present“ bewertet wurden, von ca. 32 % auf ca. 43% erhöht.

Beispiel 7:

RNA wurde aus humanem Vollblut mittels PAXgene Blood RNA System (PreAnalytix, Hombrechticon, CH) isoliert. Während der Target Präparation für die Affymetrix GeneChip-Analyse wurde zur Blockade der cDNA Synthese von alpha Globin-mRNA das PNA

Oligonukleotid alpha_465 eingesetzt. Während der Anlagerung der PNAs an die Globin mRNA Transkripte wurden zwei verschiedene Bedingungen miteinander verglichen:

- die Ausgangs-RNA, die T7-oligo(dT)₂₄ Primer und das PNA Oligonukleotid lagen in Wasser vor
- die Ausgangs-RNA, die T7-oligo(dT)₂₄ Primer und das PNA Oligonukleotid lagen in 3,5 mM (NH₄)₂SO₄ vor

Die nachfolgende GeneChip-Analyse mittels Affymetrix U133A Arrays zeigte, dass die Anlagerung des PNA Oligonukleotids in Gegenwart von Ammoniumsulfat zu einer Erhöhung der „present call“ Rate von 40,7% zu 42,8% führt.

Beispiel 8:

RNA wurde aus Jurkat Zellen (Zelllinie; akute lymphoblastische Leukämie) isoliert. In diese RNA wurden *in vitro* Transkripte eingespiked, die den alpha-1-Globin, alpha-2-Globin und Beta Globin mRNA Sequenzen entsprechen. Diese *in vitro* Transkripte trugen am 3'-Ende eine poly-A Sequenz, so dass sie, wie natürlich vorkommende mRNA Transkripte durch priming mit einem T7-oligo (dT)₂₄ Primer in cDNA umgeschrieben werden konnten. Drei verschiedene Ansätze wurden miteinander verglichen:

1. Jurkat RNA
2. Jurkat RNA mit eingespikten Globin *in vitro* Transkripten
3. Jurkat RNA mit eingespikten Globin *in vitro* Transkripten unter Verwendung von Peptid Nukleinsäuren (PNAs) zur Blockade der Globin cDNA Synthese

Verwendete PNAs im dritten Reaktionsansatz:

PNA alpha_465 in einer Endkonzentration (während der PNA Anlagerung) von 300 µM
PNA beta_594 in einer Endkonzentration (während der PNA Anlagerung) von 1 µM
PNA beta_579 in einer Endkonzentration (während der PNA Anlagerung) von 1 µM
PNA beta_554 in einer Endkonzentration (während der PNA Anlagerung) von 1 µM

Diese verschiedenen Proben wurden der Target Präparation nach Anleitung im Affymetrix „Expression Analysis Technical Manual“ unterzogen sowie eine GeneChip-Analyse auf Affymetrix U133A Arrays durchgeführt. Im Gegensatz zum Standardprotokoll wurden bei dem Ansatz unter Verwendung der PNAs folgende Protokolländerungen durchgeführt:

Die PNAs wurden vor der cDNA Synthese gemeinsam mit dem T7-Oligo(dT)₂₄ Primer zur RNA pipettiert. Zum Anlagern des Primers und der PNAs erfolgten mehrere Inkubationsschritte (10 min 70°C; 5 min 45°C; 2 min 42°C). Alle weiteren Schritte wurden wie im Standardprotokoll durchgeführt.

	Present Calls (%)	Signalintensitäten Alpha 1 Globin und Alpha 2 Globin						Signalintensitäten Beta Globin		
		204018_ x_at	209458_ x_at	211699_ x_at	211745_ x_at	214414_ x_at	217414_ x_at	209116_ x_at	211696_ x_at	217232_ x_at
Jurkat RNA	53,6									
Jurkat RNA + Globin in vitro Transkripte	44	127926	121371	125329	148827	85844	106273	120272	98209	98209
Jurkat RNA + Globin in vitro Transkripte + PNAs	51,7	67391	66178	62366	69318	47844	56675	61182	59536	52737

Tabelle 6: Ergebnisse der GeneChip-Analyse

Die Signalintensitäten für die Globin mRNA Transkripte konnten durch die Verwendung der PNAs um 40 - 60% gesenkt werden. Der Anteil an Genen, die auf dem Array als „present“ bewertet wurde, konnte bei der Probe, bei der die Globin *in vitro* Transkripte zugegeben wurde, durch Einsatz der PNA Oligonukleotide auf den ursprünglichen Anteil (Jurkat RNA ohne *in vitro* Transkripte) zurückgeführt werden.

Die Signale für die Globin mRNAs wurden durch den Einsatz der PNA Oligonukleotide nicht vollständig unterdrückt, jedoch reichte die Reduktion der Globin Signalintensitäten aus, um die „present call“ Rate auf das ursprüngliche Niveau zu erhöhen.

In Figur 3 ist die Korrelation der Signalintensitäten der Probe, in der nur Jurkat RNA verwendet wurde, mit denjenigen der Probe dargestellt, in der Jurkat RNA mit zugesetzten Globin *in vitro* Transkripten und unter PNA Verwendung analysiert wurde. Bei dieser

Abbildung sind die Gene, die die Globin-mRNA Transkripte beschreiben, aus der Analyse herausgenommen worden.

Der Korrelationskoeffizient der Signalintensitäten beträgt 0,9847. Dieser Wert weist darauf hin, dass durch die Verwendung der PNAs keine unspezifische Beeinflussung anderer auf dem Array repräsentierter Transkripte erfolgt ist.

Beispiel 9:

Das in Beispiel 8 beschriebene Experiment wurde unter Variation der PNA Oligonukleotidkonzentrationen wiederholt. Dazu wurde die Konzentration des Oligonukleotids PNA alpha_465 während der Anlagerung an die Globin-mRNA auf 600 nM verdoppelt.

	% Present Calls
Jurkat RNA	48,2
Jurkat RNA + Globin <i>in vitro</i> Transkripte	40,0
Jurkat RNA + Globin <i>in vitro</i> Transkripte + PNAs	47,4

Tabelle 7: Einfluss der Globin *in vitro* Transkripte durch die Verwendung der PNA Oligonukleotide

Auch unter diesen Bedingungen kann der negative Einfluss der Globin *in vitro* Transkripte durch die Verwendung der PNA Oligonukleotide rückgängig gemacht werden.

Beispiel 10:

gesamt-RNA wurde aus HeLa Zellen isoliert. Vier Proben dieser gesamt-RNA mit einer Konzentration von 2,14 µg/µl wurden mit 42 ng/µl cDNA (generiert aus der gesamt-RNA der HeLa Zellen) vermischt, mit einem Bindungspuffer aus dem Superscript ds-cDNA Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) versetzt und einer RT sowie einer nachfolgenden Doppelstrang cDNA Synthese unterzogen.

Nach Durchführung der enzymatischen Reaktionen erfolgte eine Aufreinigung der Proben über Silika Spin Säulen (MinElute Cleanup Kit / QIAGEN GmbH, Hilden, DE). Dabei wurden die Proben mit unterschiedlichen Waschbedingungen behandelt. Die Proben 1 und 2 wurden

gemäß dem Cleanup - Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die Aufreinigung der Proben 3 und 4 erfolgte ebenfalls in erster Linie gemäß dem Cleanup - Protokoll des Herstellers, zudem wurden die Proben jedoch, nach dem Aufbringen auf die Silika Spin Säulen bzw. vor dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer, in einem zusätzlichen Waschschriff mit 700 μ l des Waschpuffers 1 (enthaltend 3,5 M Guanidinisoithiocyanate, 25 mM Natrium Citrate, mit einem pH-Wert von 7,0) gewaschen.

Nach Elution der aufgereinigten Nukleinsäuren wurde der Anteil an RNA per RT-PCR Analyse (TaqMan-Analyse / QIAGEN GmbH, Hilden, DE) für p16 RNA (spezifisch zum Nachweis von RNA) quantifiziert (s. Fig. 4).

Zusätzlich wurde die Menge an einzelsträngiger cDNA im Eluat unter den verschiedenen Waschbedingungen quantifiziert (s. Fig. 5). Dazu wurde ein TaqMan PCR System zum Nachweis von p16 cDNA angewendet.

Die Ergebnisse aus Figur 4 und Figur 5 zeigen deutlich, dass der zusätzliche Waschschriff mit dem erfindungsgemäßen Waschpuffer zu einer äußerst effizienten Abreicherung einzelsträngiger Nukleinsäuren (RNA und cDNA) führt.

Beispiel 11:

Gemäß Beispiel 10 wurden hier 5 μ g genomische doppelsträngige Nukleinsäure (dsDNA) und 5 μ g einzelsträngige Nukleinsäure (RNA) - isoliert aus HeLa Zellen - vermischt. Nach Bindung an eine Silicamembran in Gegenwart eines Chaotrops und Alkohol (MinElute Kit / QIAGEN GmbH, Hilden, DE) wurden die Proben unter zwei verschiedenen Bedingungen vor der Elution gewaschen (Cleanup):

- a) Waschen mit ethanolhaltigem Waschpuffer gemäß der Herstellerangaben für das MinElute Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, DE)
- b) Vorgesaltetes Waschen mit 700 μ l des Waschpuffers 1 (3,5 M Guanidinisoithiocyanat und 25 mM Natrium Citrat, pH 7,0) vor dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer gemäß der Herstellerangaben für das MinElute Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, DE)

Die Proben wurden auf einem denaturierten Formaldehyd-Agarosegel analysiert (vor und nach dem Cleanup). Die Daten in Figur 6 zeigen deutlich eine effiziente Abreicherung der RNA in den Proben, die mit dem chaotropen Salze enthaltenden Waschpuffer in einem zusätzlichen Waschschriff behandelt wurden, während die genomische DNA erhalten bleibt.

Beispiel 12:

Wie in Beispiel 1 wurde auch hier aus humanem Vollblut mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) RNA isoliert. Mit jeweils 6 µg der isolierten RNA wurde eine Target Präparation für Affymetrix GeneChip Analysen gemäß dem Affymetrix „Expression Analysis Technical Manual“ durchgeführt. Die cDNA Synthese mit einem oligo dT-T7 Primer geprimt. Im Anschluss erfolgte die Zweitstrang cDNA Synthese. Die resultierenden Ansätze wurden nach der Bindung der Nukleinsäuren an Silika Spinsäule auf zwei verschiedenen Arten - unter Verwendung des MinElute Cleanup Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) - gewaschen bzw. aufgereinigt.

- a) Waschen auf der Silika Spinsäule gemäß der Herstellerangaben für das MinElute Kit ohne zusätzlichen Waschschriff
- b) Waschen auf der Silika Spinsäule inklusive eines zusätzlichen Waschschriffs mit dem Waschpuffer 1 (3,5 M Guanidinisoithiocyanat und 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0) vor dem Waschen mit einem ethanolhaltigen Waschpuffer gemäß der Herstellerangaben für das MinElute Kit.

Nachfolgend wurde die aufgereinigte cDNA in einer *in vitro* Transkriptions-Reaktion in cRNA umgeschrieben, und dabei biotinylierte Nukleotide eingebaut. Die Proben wurden nach Maßgabe des Affymetrix „Expression Analysis Technical Manual“ aufgereinigt, fragmentiert, und auf einem U133A Gen Chip hybridisiert.

Um die Ergebnisse auf den verschiedenen Arrays vergleichbar zu machen, wurden die durchschnittlichen Signalintensitäten der Proben mit einem Skaling Faktor (TGT = 10000) multipliziert. Die Ergebnisse der GeneChip-Analyse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

	Prozent "present calls"	Scaling Faktor (TGT=10000)
Probe ohne einen zusätzlichen Waschschrift (Standardbedingungen)	34,70	72,37
Probe mit einem zusätzlichen Waschschrift (mit dem Waschpuffer 1)	38,20	54,15

Tabelle 8: Ergebnisse einer GeneChip-Analyse auf U133A Gen Chips unter Verwendung unterschiedlich aufgereinigter Target Proben.

Durch den zusätzlichen Waschschrift - und der daraus resultierenden Abreicherung einzelsträngiger RNA und cDNA nach der Doppelstrangsynthese - steigt der Anteil der als "present calls" auf dem Gen Chip von 34,7% auf 38,2% (um 10%) an. Der Skaling Faktor ist für die Probe ohne den zusätzlichen Waschschrift um ca. 33% höher als bei der Probe, die mit dem zusätzlichen Waschschrift behandelt wurde. Dieses ist ein Hinweis auf eine insgesamt höhere Signalintensität des Gen Chips, der mit der Probe hybridisiert wurde, die mit dem zusätzlichen Waschschrift behandelt worden ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription eines Pools von Nukleinsäuren eines Typs (A) aus einer biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion, gekennzeichnet durch die selektive Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure des Typs (A) und/oder die selektive Unterdrückung der Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription mindestens einer unerwünschten Nukleinsäure des Typs (A).
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure des Typs (A) mRNA ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unerwünschte Nukleinsäure des Typs (A) eine mRNA ist, die einen Anteil von 20% oder mehr an der gesamt-mRNA hat.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 3, umfassend folgende Verfahrensschritte
 - a) durchführen einer reversen Transkriptions-Reaktion einer RNA aus einer biologischen Probe oder einer enzymatischen Reaktion in Anwesenheit mindestens eines oligo-dT Primers,
 - b) optional nach Schritt a) durchführen einer cDNA-Zweitstrangsynthese,
 - c) optional nach Schritt b) Aufreinigung der ds-cDNA unter gleichzeitiger Abreicherung aller einzelsträngigen Nukleinsäuren aus dem Reaktionsprodukt aus Schritt b),
 - d) optional nach Schritt a) und/oder b) und/oder c) durchführen einer Amplifikation der cDNA.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte a) und/oder d) in Anwesenheit mindestens einer Molekül-Spezies zur selektiven Unterdrückung der reversen Transkription mindestens einer unerwünschten mRNA, wobei die Molekül-Spezies die reversen Transkription der unerwünschten mRNA verhindert, und/oder zur selektiven Unterdrückung der Amplifikation eines Produktes der reversen

Transkription mindestens einer unerwünschten mRNA, wobei die Molekül-Spezies die Amplifikation der aus der unerwünschten mRNA hergestellten einzelsträngigen oder doppelsträngigen cDNA verhindert, durchgeführt werden.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in der reversen Transkriptions-Reaktion eine reverse Transkriptase mit intrinsischer RNase H-Aktivität eingesetzt wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der biologischen Probe um Vollblut, Muskelgewebe oder neuronales Gewebe handelt, oder es sich um eine mit Vollblut, Muskelgewebe oder neuronalem Gewebe kontaminierte Probe handelt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Vollblut ist, und dass das Vollblut in einem Stabilisierungsreagenz aufgenommen und/oder gelagert wird.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Stabilisierungsreagenz in einem Blutentnahmeröhrchen enthalten ist und das Blut unmittelbar bei der Abnahme in das Stabilisierungsreagenz überführt wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Stabilisierungsreagenz ein Tetra-Alkyl-Ammoniumsalz in Gegenwart einer organischen Säure enthält.
11. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Stabilisierungsreagenz mindestens eine Guanidin-Verbindung, eine Puffersubstanz, ein Reduktionsmittel und ein Detergenz enthält.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe Vollblut ist, und dass die unerwünschte Nukleinsäure des Typs (A) Globin-mRNA ist.
13. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass zur Aufreinigung einer ds-cDNA in Schritt c) zunächst die aus Schritt b) und/oder die aus dem optionalen

Schritt d) stammenden Nukleinsäuren in ihrer Gesamtheit an eine Silicamatrix gebunden werden und anschließend die Silicamatrix zur Abreicherung der einzelsträngigen Nukleinsäuren mit einem Guanidin-haltigen Waschpuffer gewaschen wird.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Silicamatrix eine oder mehrere Silicamembran(en) oder Silicapartikel, insbesondere magnetische Silicapartikel, verwendet werden.
15. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Guanidin-haltige Waschpuffer Guanidinisothiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat in einer Konzentration von 1 M bis 7 M, bevorzugt von 2,5 M bis 6 M und besonders bevorzugt von 3 M bis 5,7 M enthält.
16. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Guanidin-haltige Waschpuffer Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von 4 M bis 9 M, bevorzugt von 5 M bis 8 M, enthält.
17. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine zur mRNA oder zu einem der cDNA-Stränge komplementäres DNA-Oligonukleotid und/oder RNA-Oligonukleotid ist, oder ein entsprechendes Oligonukleotid aus DNA- und/oder RNA-Derivaten, oder ein entsprechendes DNA- und/oder RNA-Oligonukleotid enthaltend modifizierte oder artifizielle Nukleotide, Quencher oder Fluorophore.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine Länge von 10 bis 60 Nukleotiden, vorzugsweise von 12 bis 30 Nukleotiden, aufweist.
19. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine zur mRNA oder zu einem der cDNA-Stränge komplementäres Nukleinsäure-Analogon ist.
20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäure-Analogon PNA, LNA oder GripNA ist.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die PNA eine Länge von 12 bis 20 Nukleotidanaloga, vorzugsweise von 13 bis 16 Nukleotidanaloga, aufweist.

22. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die LNA mindestens ein Nukleotid aufweist, welches ein 'locked nucleotide' ist, und dass die LNA eine Länge von 14 bis 30 Nukleotide, vorzugsweise von 15 bis 22 Nukleotide, aufweist.
23. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die GripNA eine Länge von 12 bis 30 Nukleotidanaloga, vorzugsweise von 14 bis 20 Nukleotidanaloga, aufweist.
24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies in der 3'-Region der mRNA oder einer der cDNA-Stränge bindet.
25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 und 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Molekül-Spezies eingesetzt werden, die komplementär zu verschiedenen Regionen einer oder mehrerer spezifischen mRNA(s) bzw. mindestens eines Stranges einer oder mehrerer spezifischer cDNA(s) sind.
26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 und 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Molekül-Spezies eingesetzt wird, die komplementär zu einer homologen Region verschiedener mRNAs oder cDNAs ist.
27. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 und 17 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies an ihrem 3'-Ende eine Modifikation aufweist, die verhindert, dass eine Elongation am 3'-Ende der Molekül-Spezies initialisiert werden kann.
28. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies ein Ribozym ist.
29. Verfahren gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies ein hammerhead ribozyme oder ein hairpin ribozyme ist.
30. Verfahren gemäß Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Ribozym aus RNA oder einem RNA-Derivat besteht oder Fusionsprodukte solcher Ribozyme verkörpert.

31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die zur unerwünschten mRNA oder cDNA komplementäre Sequenz der Ribozyme eine Länge von 12 bis 30 Nukleotiden, vorzugsweise von 15 bis 25 Nukleotiden, aufweist.
32. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies ein DNAzym ist.
33. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies ein DNA-Oligonukleotid ist und die Globin-mRNA eine alpha 1 Globin-mRNA und/oder eine alpha 2 Globin-mRNA verkörpert, wobei das DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aus der Gruppe von
- a) 5' CTC CAG CTT AAC GGT - Phosphatgruppe - 3'
 - b) 5' TAA CGG TAT TTG GAG - Phosphatgruppe - 3'
 - c) 5' TAA CGG TAT TTG GAG GTC AGC ACG GTG CTC - Phosphatgruppe - 3'
- aufweist.
34. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies ein DNA-Oligonukleotid ist und die Globin-mRNA eine beta Globin-mRNA verkörpert, wobei das DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aus der Gruppe von
- a) 5' GTA GTT GGA CTT AGG - Phosphatgruppe - 3'
 - b) 5' ATC CAG ATG CTC AAG - Phosphatgruppe - 3'
 - c) 5' GTA GTT GGA CTT AGG GAA CAA AGG AAC CTT - Phosphatgruppe - 3'
- aufweist.
35. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine PNA ist und die Globin-mRNA eine alpha 1 Globin-mRNA und/oder eine alpha 2 Globin-mRNA verkörpert, wobei die PNA eine Sequenz aus der Gruppe von
- a) N- CTC CAG CTT AAC GGT -C*
 - b) N- TAA CGG TAT TTG GAG -C*
 - c) N- GTC ACC AGC AGG CA -C*
 - d) N- GTG AAC TCG GCG -C*
 - e) N- TGG CAA TTC GAC CTC -C*

- f) N- GAG GTT TAT GGC AAT -C*
- g) N- ACG GAC GAC CAC TG -C*
- h) N- GCG GCT CAA GTG -C*

aufweist.

36. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine PNA ist und die Globin-mRNA eine beta Globin-mRNA verkörpert, wobei die PNA eine Sequenz aus der Gruppe von

- a) N- GTA GTT GGA CTT AGG -C*
- b) N- ATC CAG ATG CTC AAG -C*
- c) N- CCC CAG TTT AGT AGT -C*
- d) N- CAG TTT AGT AGT TGG -C*
- e) N- GCC CTT CAT AAT ATC -C*
- f) N- GGA TTC AGG TTG ATG -C*
- g) N- GAA CTC GAT GAC CTA -C*
- h) N- TGA TGA TTT GAC CCC -C*
- i) N- GGT TGA TGA TTT GAC -C*
- j) N- CTA TAA TAC TTC CCG -C*

aufweist.

37. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine LNA, aufweisend mindestens ein Nukleotid, welches ein 'locked nucleotide' ist, ist und die Globin-mRNA eine alpha 1-Globin-mRNA und/oder eine alpha 2-Globin-mRNA verkörpert, wobei die LNA eine Sequenz aus der Gruppe von

- a) 5' CTC CAG CTT AAC GGT - Oktandiol - 3'
- b) 5' TAA CGG TAT TTG GAG - Oktandiol -3'
- c) 5' GTC ACC AGC AGG CA - Oktandiol -3'
- d) 5' GTG AAC TCG GCG - Oktandiol -3'

aufweist.

38. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5, 12 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Molekül-Spezies eine LNA, aufweisend mindestens ein Nukleotid, welches ein 'locked

nucleotide' ist, ist und die Globin-mRNA eine beta Globin-mRNA verkörpert, wobei die LNA eine Sequenz aus der Gruppe von

- a) 5' GTA GTT GGA CTT AGG - Oktandiol -3'
- b) 5' ATC CAG ATG CTC AAG - Oktandiol -3'
- c) 5' CCC CAG TTT AGT AGT - Oktandiol -3'
- d) 5' CAG TTT AGT AGT TGG - Oktandiol -3'
- e) 5' GCC CTT CAT AAT ATC - Oktandiol -3'

aufweist.

39. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1, 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation eine *in vitro* Transkription umfasst.
40. Verfahren gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass sich an die *in vitro* Transkription ein DNase-Verdau sowie die Aufreinigung der cRNA anschließt.
41. Verwendung von cRNA resultierend aus einem Verfahren gemäß Anspruch 39 oder 40 in einer Gen-Expressions-Analyse.
42. Verwendung von cDNA resultierend aus einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 38 in einer Gen-Expressions-Analyse.
43. Verwendung eines Waschpuffers, enthaltend mindestens eine Guanidin-Verbindung in einer Gesamtkonzentration von 1 M bis 9 M, wobei die Guanidin-Verbindung Guanidin-isothiocyanat in einer Konzentration von 1 M bis 7 M, bevorzugt von 2,5 M bis 6 M und besonders bevorzugt von 3 M bis 5,7 M ist, und/oder die Guanidin-Verbindung Guanidinthiocyanat in einer Konzentration von 1 M bis 7 M, bevorzugt von 2,5 M bis 6 M und besonders bevorzugt von 3 M bis 5,7 M ist und/oder die Guanidin-Verbindung Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von 4 M bis 9 M, bevorzugt von 5 M bis 8 M ist, in einem Verfahren zur Trennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren von doppelsträngigen Nukleinsäuren, bevorzugt in einem Verfahren zur Elution einzelsträngiger Nukleinsäuren von einer Silicamatrix und besonders bevorzugt in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.

44. Verwendung gemäß Anspruch 43, wobei der Waschpuffer weiterhin eine oder mehrere Puffersubstanz(en) in einer Gesamtkonzentration von 0 mM bis 40 mM und/oder ein oder mehrere Additiv(e) in einer Gesamtkonzentration von 0 mM bis 100 mM und/oder ein oder mehrere Detergenz(ien) in einer Gesamtkonzentration von 0 %(v/v) bis 20 %(v/v), wobei der Waschpuffer einen pH-Wert von 5 bis 9 aufweist, enthält.
45. Verwendung gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Gesamtkonzentration der Puffersubstanzen 20 mM bis 40 mM beträgt.
46. Verwendung gemäß Anspruch 44 oder 45, dadurch gekennzeichnet, dass die Puffersubstanz Tris, Tris-HCl, MOPS, MES, CHES, HEPES, PIPES und/oder Natriumcitrat ist.
47. Verwendung gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass das Additiv ein Chelatbildner ist.
48. Verwendung gemäß Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelatbildner EDTA und/oder EGTA ist.
49. Verwendung gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergenz Tween 20, Triton X 100, Sarcosyl und/oder NP 40 ist.
50. Verwendung gemäß Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des Waschpuffers in einem Bereich von 6 bis 8 liegt.
51. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 43 bis 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Guanidin-Verbindung Guanidinisothiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat ist und die Puffersubstanz Natriumcitrat ist, wobei der Waschpuffer einen pH-Wert im Bereich von 6 bis 8 aufweist.
52. Verwendung gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass der Waschpuffer Guanidinisothiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat in einer Gesamtkonzentration von 3,2 M bis 3,8 M sowie Natriumcitrat in einer Konzentration von 20 mM bis 30 mM enthält und einen pH-Wert von 6,8 bis 7,7 aufweist.

53. Verwendung gemäß Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass der Waschpuffer Guanidinisoithiocyanat und/oder Guanidinthiocyanat in einer Gesamtkonzentration von 3,5 M sowie Natriumcitrat in einer Konzentration von 25 mM enthält und einen pH-Wert von 7,0 aufweist.

1 / 3



Fig. 1

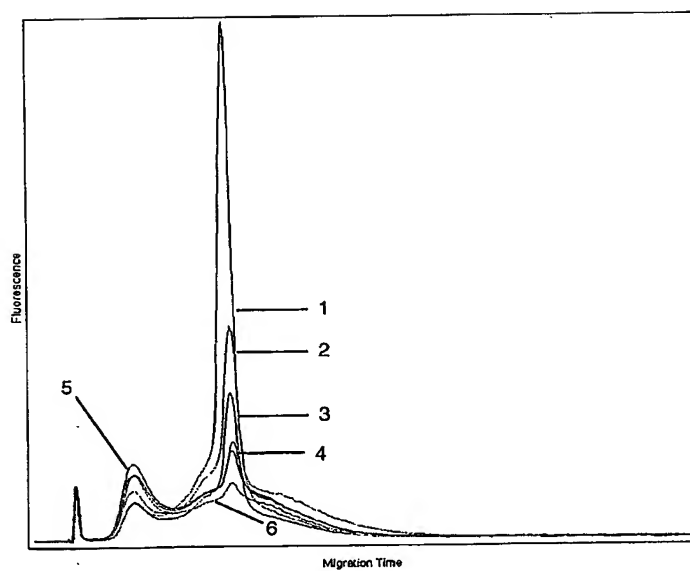


Fig. 2

BEST AVAILABLE COPY

2 / 3

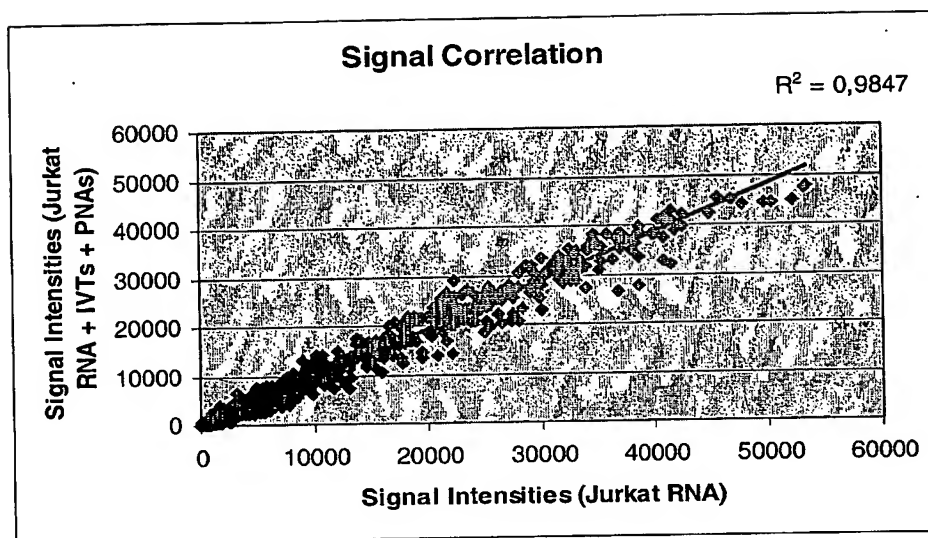


Fig. 3

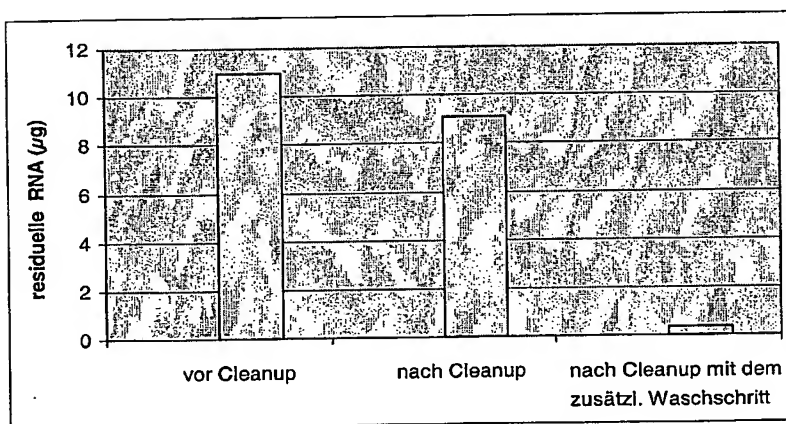


Fig. 4

BEST AVAILABLE COPY

3 / 3

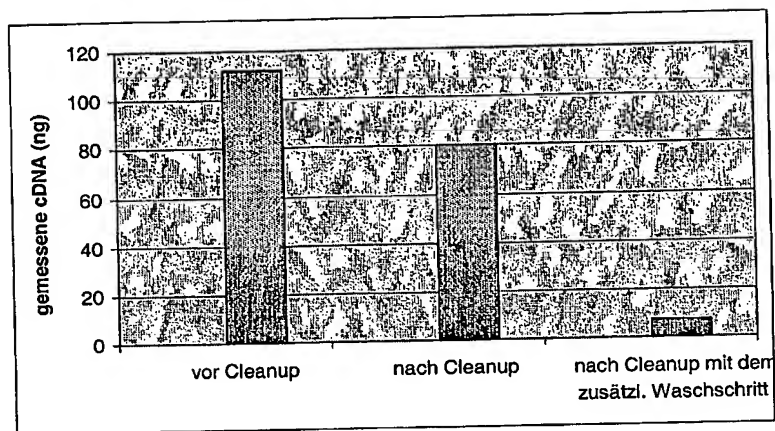


Fig. 5

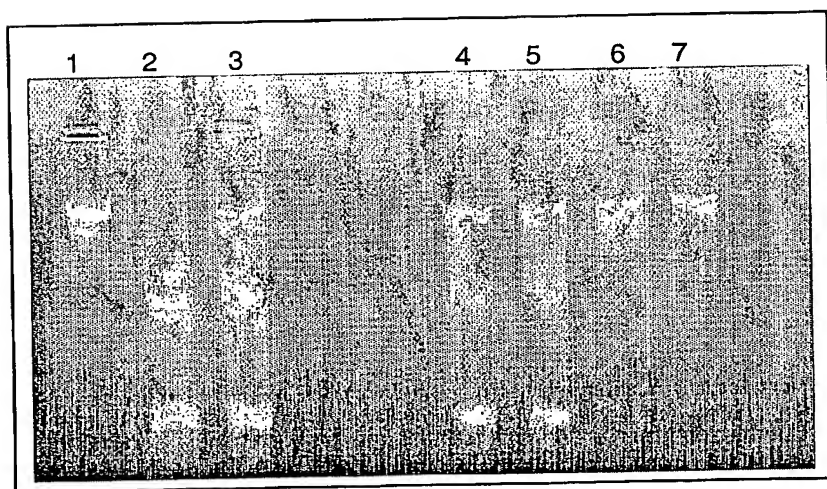


Fig. 6

SEQUENCE LISTING

<110> QIAGEN GmbH
 <120> verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation von Nukleinsäuren
 <130> PA103-PCT
 <150> US 60/489,643
 <151> 2003-07-24
 <160> 33
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 1
 ctccagctta acggt 15
 <210> 2
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 2
 taacggtatt tggag 15
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 3
 taacggtatt tggaggtcag cacggtgctc 30
 <210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 4
 gtagttggac ttagg 15
 <210> 5
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 5
 atccagatgc tcaag 15
 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> DNA oligonucleotides with a 3' phosphate terminal end
 <400> 6
 gtagttggac ttagggaaca aaggaacctt 30

<210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 7 15
 ctccagctta acggt

<210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 8 15
 taacggtatt tggag

<210> 9
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 9 14
 gtcaccagca ggca

<210> 10
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 10 12
 gtgaactcgg cg

<210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 11 15
 tggcaattcg acctc

<210> 12
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 12 15
 gaggtttatg gcaat

<210> 13
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end

 <400> 13 14
 acggacgacc actg

<210> 14
 <211> 12
 <212> DNA

<213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 14 12
 gcggctcaag tg

<210> 15
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 15 15
 gtagttggac ttagg

<210> 16
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 16 15
 atccagatgc tcaag

<210> 17
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 17 15
 ccccagttta gtagt

<210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 18 15
 cagtttagta gttgg

<210> 19
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 19 15
 gcccttcata atatc

<210> 20
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 20 15
 ggattcaggt tgatg

<210> 21
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 21 15
 gaactcgatg accta

<210> 22
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 22
 tgatgatttg acccc 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 23
 ggttgatgat ttgac 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> PNA with a 5' amino terminal end and a 3' carboxy terminal end
 <400> 24
 ctataataact tcccg 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> LNA with an octandiol group at the 3' end
 <400> 25
 ctccagctta acggt 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> LNA with an octandiol group at the 3' end
 <400> 26
 taacggtatt tggag 15

<210> 27
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> LNA with an octandiol group at the 3' end
 <400> 27
 gtcaccagca ggca 14

<210> 28
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> LNA with an octandiol group at the 3' end
 <400> 28
 gtgaactcgg cg 12

<210> 29
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> LNA with an octandiol group at the 3' end

<400> 29		
gtagttggac ttagg		15
<210> 30		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> LNA with an octandiol group at the 3' end		
<400> 30		
atccagatgc tcaag		15
<210> 31		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> LNA with an octandiol group at the 3' end		
<400> 31		
ccccagttta gtagt		15
<210> 32		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> LNA with an octandiol group at the 3' end		
<400> 32		
cagtttagta gttgg		15
<210> 33		
<211> 15		
<212> DNA		
<213> LNA with an octandiol group at the 3' end		
<400> 33		
gcccttcata atatc		15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008363

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/32931 A (CURAGEN CORPORATION) 10 May 2001 (2001-05-10)	1-7, 17-27, 39,41,42 33-38
A	abstract page 3, line 12 - line 16 page 6, line 20 page 7, line 10 - page 9, line 9; claims 1-20; figures 2,3	
X	US 5 891 625 A (NIELSEN PETER EIGIL ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06)	1-5, 17-21 33-38
A	abstract column 1, line 52 - column 2, line 7 column 2, line 24 - line 48; claims 1-7,12-15	
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 December 2004

Date of mailing of the international search report

11.03.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tilkorn, A-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008363

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/00599 A (QIAGEN GMBH ; HOLLAENDER VERA (DE); OELMUELLER UWE (DE); WYRICH RALPH) 3 January 2002 (2002-01-03) -cited in the application the whole document -----	8-10,12
A	WO 01/60517 A (ANTIGEN PRODUKTIONS GMBH ; HELFTENBEIN ELKE (DE)) 23 August 2001 (2001-08-23) the whole document -----	8,9,11, 12
A	NIELSEN P E ET AL: "SEQUENCE-SPECIFIC TRANSCRIPTION ARREST BY PEPTIDE NUCLEIC ACID BOUND TO THE DNA TEMPLATE STRAND" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 149, 1994, pages 139-145, XP002022886 ISSN: 0378-1119 the whole document -----	19-21, 35,36
A	PETERSEN M ET AL: "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 74-81, XP004405626 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	19,20, 22,37,38
A	EFIMOV VLADIMIR A ET AL: "Synthesis of polyacrylamides N-substituted with PNA-like oligonucleotide mimics for molecular diagnostic applications" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 4416-4426, XP002308457 ISSN: 0305-1048 the whole document -----	19,20,23
A	CA 2 442 092 A (RIBOZYME PHARM INC) 17 October 2002 (2002-10-17) abstract page 17, paragraph 3 - page 19, paragraph 3; examples 1-4,21,25; table I -----	28-32
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008363

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HOMANN M ET AL: "INCORPORATION OF THE CATALYTIC DOMAIN OF A HAMMERHEAD RIBOZYME INTO ANTISENSE RNA ENHANCES ITS INHIBITORY EFFECT ON THE REPLICATION OF HUMAN-IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 21, no. 12, 1993, pages 2809-2814, XP002051227 ISSN: 0305-1048 the whole document</p> <p>-----</p>	28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 6-11, 39-42 (partly); 5, 12, 17-38 (as a whole)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-4, 6-11, 39-42 (in part); 5, 12, 17-38 (in full)

method of reverse transcription and/or amplification of a product of a reverse transcription of a pool of nucleic acids of one type (A) from a biological sample, characterized by the presence of at least one molecular species that hinders the reverse transcription of at least one undesirable mRNA or the amplification of single-stranded or double-stranded cDNA made from the undesirable mRNA.

2. Claims 1-4, 6-11, 39-42 (in part); 13-16, 43-53 (in full)

use of a guanidine-containing wash buffer in methods that include the separation of single-stranded nucleic acids from double-stranded nucleic acids, for example in a method of reverse transcription and amplification of a pool of nucleic acids.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008363

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0132931	A	10-05-2001	AU 3640201 A CA 2388619 A1 EP 1226281 A2 JP 2003534772 T WO 0132931 A2	14-05-2001 10-05-2001 31-07-2002 25-11-2003 10-05-2001
US 5891625	A	06-04-1999	AU 674520 B2 AU 4323593 A CA 2136831 A1 CZ 9402951 A3 DE 69307317 D1 DE 69307317 T2 EP 0646181 A1 FI 945725 A HU 71931 A2 JP 3061064 B2 JP 8501681 T KR 140836 B1 NO 944655 A SK 149394 A3 AT 147441 T DK 646181 T3 WO 9325706 A1 ES 2098752 T3 US 5972610 A	02-01-1997 04-01-1994 23-12-1993 13-09-1995 20-02-1997 22-05-1997 05-04-1995 05-12-1994 28-02-1996 10-07-2000 27-02-1996 15-06-1998 03-02-1995 10-01-1996 15-01-1997 13-10-1997 23-12-1993 01-05-1997 26-10-1999
WO 0200599	A	03-01-2002	DE 10031236 A1 AU 6903101 A AU 7568501 A BR 0112002 A CA 2410388 A1 CA 2412534 A1 CN 1438988 T CZ 20024129 A3 WO 0200599 A1 WO 0200600 A1 EP 1294676 A1 EP 1296932 A1 HU 0301342 A2 JP 2004501621 T JP 2004501622 T PL 360705 A1 SK 18022002 A3 US 2003165943 A1 US 2004014703 A1	10-01-2002 08-01-2002 08-01-2002 13-05-2003 28-11-2002 17-12-2002 27-08-2003 18-06-2003 03-01-2002 03-01-2002 26-03-2003 02-04-2003 28-08-2003 22-01-2004 22-01-2004 20-09-2004 01-07-2003 04-09-2003 22-01-2004
WO 0160517	A	23-08-2001	DE 10006662 A1 AU 3547901 A BR 0108364 A CA 2399990 A1 CN 1434746 T WO 0160517 A2 EP 1257364 A2 JP 2003524782 T US 2003143566 A1 ZA 200207361 A	23-08-2001 27-08-2001 06-01-2004 23-08-2001 06-08-2003 23-08-2001 20-11-2002 19-08-2003 31-07-2003 14-05-2003
CA 2442092	A	17-10-2002	US 2003171311 A1	11-09-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008363

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CA 2442092	A	US 2003068301 A1	10-04-2003
		CA 2442092 A1	17-10-2002
		EP 1383782 A1	28-01-2004
		JP 2004532022 T	21-10-2004
		WO 02081494-A1	17-10-2002
		US 2004127446 A1	01-07-2004
		US 2003206887 A1	06-11-2003
		US 2004054156 A1	18-03-2004
		US 2003140362 A1	24-07-2003
		US 2003148985 A1	07-08-2003
		AU 2003219817 A1	09-09-2003
		CA 2457528 A1	28-08-2003
		EP 1430157 A2	23-06-2004
		GB 2397062 A	14-07-2004
		WO 03070750 A2	28-08-2003
		US 2004209831 A1	21-10-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008363

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beiz. Anspruch Nr.
X	WO 01/32931 A (CURAGEN CORPORATION) 10. Mai 2001 (2001-05-10)	1-7, 17-27, 39, 41, 42 33-38
A	Zusammenfassung Seite 3, Zeile 12 - Zeile 16 Seite 6, Zeile 20 Seite 7, Zeile 10 - Seite 9, Zeile 9; Ansprüche 1-20; Abbildungen 2,3	
X	US 5 891 625 A (NIELSEN PETER EIGIL ET AL) 6. April 1999 (1999-04-06)	1-5, 17-21 33-38
A	Zusammenfassung Spalte 1, Zeile 52 - Spalte 2, Zeile 7 Spalte 2, Zeile 24 - Zeile 48; Ansprüche 1-7, 12-15	
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : * A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist * E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist * L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) * O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht * P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist * T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist * X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden * Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist * &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. Dezember 2004		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 11.03.2005
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Tilkorn, A-C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008363

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/00599 A (QIAGEN GMBH ; HOLLAENDER VERA (DE); OELMUELLER UWE (DE); WYRICH RALPH) 3. Januar 2002 (2002-01-03) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	8-10,12
A	WO 01/60517 A (ANTIGEN PRODUKTIONS GMBH ; HELFTENBEIN ELKE (DE)) 23. August 2001 (2001-08-23) das ganze Dokument -----	8,9,11, 12
A	NIELSEN P E ET AL: "SEQUENCE-SPECIFIC TRANSCRIPTION ARREST BY PEPTIDE NUCLEIC ACID BOUND TO THE DNA TEMPLATE STRAND" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Bd. 149, 1994, Seiten 139-145, XP002022886 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument -----	19-21, 35,36
A	PETERSEN M ET AL: "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 2, Februar 2003 (2003-02), Seiten 74-81, XP004405626 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument -----	19,20, 22,37,38
A	EFIMOV VLADIMIR A ET AL: "Synthesis of polyacrylamides N-substituted with PNA-like oligonucleotide mimics for molecular diagnostic applications" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 27, Nr. 22, 15. November 1999 (1999-11-15), Seiten 4416-4426, XP002308457 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument -----	19,20,23
A	CA 2 442 092 A (RIBOZYME PHARM INC) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Zusammenfassung Seite 17, Absatz 3 - Seite 19, Absatz 3; Beispiele 1-4,21,25; Tabelle I -----	28-32

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008363

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>HOMANN M ET AL: "INCORPORATION OF THE CATALYTIC DOMAIN OF A HAMMERHEAD RIBOZYME INTO ANTISENSE RNA ENHANCES ITS INHIBITORY EFFECT ON THE REPLICATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 21, Nr. 12, 1993, Seiten 2809-2814, XP002051227 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument -----</p>	28-32

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008363

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-4, 6-11, 39-42 (teilweise); 5, 12, 17-38 (vollständig)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-4,6-11, 39-42 (teilweise), 5,12,17-38 (vollständig)

Verfahren zur reversen Transkription und/oder Amplifikation eines Produktes einer reversen Transkription eines Pools von Nukleinsäuren eines Typs (A) aus einer biologischen Probe gekennzeichnet durch die Anwesenheit mindestens einer Molekül Spezies, welche die reverse Transkription mindestens einer unerwünschten mRNA bzw die Amplifikation aus der unerwünschten mRNA hergestellter einzelsträngiger oder doppelsträngiger cDNA verhindert.

2. Ansprüche: 1-4,6-11,39-42 (teilweise) 13-16,43-53 (vollständig)

Verwendung eines Guanidin-haltigen Waschpuffers in Verfahren, die die Trennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren von doppelsträngigen Nukleinsäuren umfassen, zum Beispiel in einem Verfahren zur reversen Transkription und Amplifikation eines Pools von Nukleinsäuren.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008363

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0132931 A	10-05-2001	AU 3640201 A CA 2388619 A1 EP 1226281 A2 JP 2003534772 T WO 0132931 A2	14-05-2001 10-05-2001 31-07-2002 25-11-2003 10-05-2001
US 5891625 A	06-04-1999	AU 674520 B2 AU 4323593 A CA 2136831 A1 CZ 9402951 A3 DE 69307317 D1 DE 69307317 T2 EP 0646181 A1 FI 945725 A HU 71931 A2 JP 3061064 B2 JP 8501681 T KR 140836 B1 NO 944655 A SK 149394 A3 AT 147441 T DK 646181 T3 WO 9325706 A1 ES 2098752 T3 US 5972610 A	02-01-1997 04-01-1994 23-12-1993 13-09-1995 20-02-1997 22-05-1997 05-04-1995 05-12-1994 28-02-1996 10-07-2000 27-02-1996 15-06-1998 03-02-1995 10-01-1996 15-01-1997 13-10-1997 23-12-1993 01-05-1997 26-10-1999
WO 0200599 A	03-01-2002	DE 10031236 A1 AU 6903101 A AU 7568501 A BR 0112002 A CA 2410388 A1 CA 2412534 A1 CN 1438988 T CZ 20024129 A3 WO 0200599 A1 WO 0200600 A1 EP 1294676 A1 EP 1296932 A1 HU 0301342 A2 JP 2004501621 T JP 2004501622 T PL 360705 A1 SK 18022002 A3 US 2003165943 A1 US 2004014703 A1	10-01-2002 08-01-2002 08-01-2002 13-05-2003 28-11-2002 17-12-2002 27-08-2003 18-06-2003 03-01-2002 03-01-2002 26-03-2003 02-04-2003 28-08-2003 22-01-2004 22-01-2004 20-09-2004 01-07-2003 04-09-2003 22-01-2004
WO 0160517 A	23-08-2001	DE 10006662 A1 AU 3547901 A BR 0108364 A CA 2399990 A1 CN 1434746 T WO 0160517 A2 EP 1257364 A2 JP 2003524782 T US 2003143566 A1 ZA 200207361 A	23-08-2001 27-08-2001 06-01-2004 23-08-2001 06-08-2003 23-08-2001 20-11-2002 19-08-2003 31-07-2003 14-05-2003
CA 2442092 A	17-10-2002	US 2003171311 A1	11-09-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008363

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
CA 2442092 A		US 2003068301 A1	10-04-2003
		CA 2442092 A1	17-10-2002
		EP 1383782 A1	28-01-2004
		JP 2004532022 T	21-10-2004
		WO 02081494 A1	17-10-2002
		US 2004127446 A1	01-07-2004
		US 2003206887 A1	06-11-2003
		US 2004054156 A1	18-03-2004
		US 2003140362 A1	24-07-2003
		US 2003148985 A1	07-08-2003
		AU 2003219817 A1	09-09-2003
		CA 2457528 A1	28-08-2003
		EP 1430157 A2	23-06-2004
		GB 2397062 A	14-07-2004
		WO 03070750 A2	28-08-2003
		US 2004209831 A1	21-10-2004
